

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Botanika



**Bc. František Sklenář**

**Objasnění druhových hranic v sekci *Restricti* rodu  
*Aspergillus* na základě multigenové fylogeneze a  
analýzy fenotypu**

Species limits within *Aspergillus* section *Restricti* inferred  
from multiple gene phylogenies and phenotype analysis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Vít Hubka

Praha 2016

## Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15.8.2016

František Sklenář

# Poděkování

Mé díky patří zejména mému školiteli Mgr. Vítu Hubkovi. Děkuji za nesmírně časově náročné vedení mé práce, za všechny rady a připomínky, za umožnění práce na zajímavém tématu, ale i za to, že se vždy zajímal i o můj názor a pohled na věc.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, PhD., vedoucímu Laboratoře genetiky a metabolismu hub MBÚ AV ČR, ve které jsem vypracovával velkou část práce. Děkuji za inspiraci, kterou mi svým přístupem poskytl.

Mgr. Martinu Kostovčíkovi a RNDr. Aleně Novákové, CSc. děkuji za velké množství praktických rad a RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za předání zkušeností se skenovací elektronovou mikroskopií.

Za izolaci DNA děkuji RNDr. Miladě Chudíčkové a Aleně Gabrielové.

Všem kolegům z kryptogamologického oddělení katedry botaniky PřF UK děkuji za přátelskou atmosféru a nezištnou pomoc se studijními i jinými záležitostmi.

Rád bych také poděkoval doc. RNDr. Jiřímu Gabrielovi, DrSc., který má hlavní zásluhu na tom, jakým směrem jsem se po svém bakalářském studiu vydal.

V neposlední řadě musím poděkovat své přítelkyni a rodině za obrovskou podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

# Abstrakt

Sekce *Restricti* je jednou z posledních sekcí rodu *Aspergillus*, která dosud nebyla revidována v moderní taxonomické éře. Jedná se o osmofilní druhy s jednoduchou morfologií, jejichž hlavní význam spočívá ve znehodnocování potravin, krmiva a osiva, navíc některé druhy negativně ovlivňují vnitřní ovzduší budov. Při poslední taxonomické revizi z roku 2008 založené pouze na molekulárně genetických datech zahrnovala sekce sedm druhů. V této práci bylo studováno celkem 126 izolátů této sekce, pocházejících ze čtyř kontinentů, včetně ex-typových kmenů. Revize sekce byla provedena přístupem kombinujícím molekulárně fylogenetické analýzy s tradičními taxonomickými metodami. Pro rekonstrukci fylogeneze byly využity moderní metody vymezení druhů založené na modelu mnohodruhové koalescence (multispecies coalescent model). Z tradičních metod byla zahrnuta analýza morfologie (makro- a mikromorfologie, včetně skenovací elektronové mikroskopie) a fyziologie (růst v osmotickém gradientu při několika kultivačních teplotách). Kromě sedmi popsáných druhů bylo analýzou odhaleno osm nových, dosud nepopsáných druhů. Nejvíce nových druhů bylo nalezeno v rámci komplexu *Aspergillus penicillioides*.

**Klíčová slova:** *Aspergillus restrictus*, osmofilní houby, delimitace druhů, model mnohodruhové koalescence, multigenová fylogeneze, osmotický gradient

# Abstract

Section *Restricti* is one of the last sections of the genus *Aspergillus* that hasn't been revised in the modern taxonomic era. All species are osmophilic, have simple morphology and they are mainly important because of the food, feed and seed spoilage, some of them also have negative influence to the indoor air. The section consists of seven species according to the last taxonomic revision from 2008 based only on molecular data. It currently consists of six asexual and one homothalic species. 126 isolates from the section coming from four continents were studied in this thesis, including ex-type strains. Revision of the section was carried out combining molecular phylogenetic analysis and conventional taxonomic methods. Modern methods of species delimitation based on multispecies coalescent model were used for the phylogenetic reconstruction. From the conventional methods analysis of morphology (macro- and micromorphology including scanning electron microscopy) and physiology (ability of growing in osmotic gradient and several different temperatures) was performed. Apart from the seven known species, eight new undescribed species were discovered. Majority of the new species belongs to the *Aspergillus penicillioides* species complex.

**Key words:** *Aspergillus restrictus*, osmophilic fungi, species delimitation, multispecies coalescent model, multigene phylogeny, osmotic gradient

# Předmluva

Předkládaná práce navazuje na mou bakalářskou práci s názvem Mechanismy adaptace vláknitých hub na vodní stres, která se zabývala osmofilními houbami v širším kontextu. Diplomová práce se zabývá konkrétní skupinou osmofilních hub, sekci *Restricti* rodu *Aspergillus*. Přestože se jedná o poměrně ekonomicky významnou skupinu osmofilních hub, její důkladná taxonomická revize zatím nebyla provedena na rozdíl od jiných, často neporovnatelně méně významných skupin osmofilních hub. Volba studované skupiny také vyplývala ze zaměření našeho pracoviště, které se taxonomií rodu *Aspergillus* dlouhodobě věnuje a předchozí spolupráce s Dr. Stephenem Petersonem (Agricultural Research Service, Peoria, IL, USA), který se již dříve touto sekci okrajově zabýval. V průběhu práce byla rozvinuta spolupráce také s dalšími zahraničními pracovišti, kde se při své práci se zástupci sekce *Restricti* také setkávají. Zejména se jednalo o Dr. Željka Jurjeviće (EMSL Analytical, New Jersey, USA), Prof. Roberta A. Samsona (CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Nizozemsko) a Dr. Polonu Zalar (Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Lublaň, Slovinsko). Zájem o osmofilní a jiné extremofilní houby v posledních letech vzrůstá, s čímž souvisí i vyšší frekvence izolací těchto druhů. V minulosti byla totiž řada těchto skupin opomíjena kvůli užívání izolačních médií, na kterých jsou tyto druhy obtížně kultivovatelné, nebo vůbec nerostou.

Cíle této práce byly následující:

- 1) Provést taxonomickou revizi sekce: ověření platnosti dříve popsáných druhů a identifikace případných nepopsaných druhů.
- 2) Prozkoumat možnosti využití schopnosti růstu v osmotickém a teplotním gradientu jako taxonomického znaku.
- 3) Zjistit, které fenotypové znaky jsou stabilní a taxonomicky významné z hlediska možnosti odlišení druhů a jejich identifikace.
- 4) Začlenit moderní metody delimitace druhů založené na modelu mnohodruhové koalescence (multispecies coalescent model) do polyfázické taxonomie rodu *Aspergillus*.

Práce si dává také za cíl být předlohou pro další taxonomické revize u osmofilních hub, kde bývá zapotřebí speciální přístup, a použité metodiky jsou nejednotné. Na základě dat získaných v této práci by měla být v brzké budoucnosti publikována monografie sekce *Restricti*.

# Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Osmofilní houby .....	8
1.1.1	Terminologie .....	8
1.1.2	Využití osmotolerance v taxonomii.....	8
1.2	Rod <i>Aspergillus</i> .....	8
1.3	Sekce <i>Restricti</i> .....	8
1.4	Taxonomie rodu <i>Aspergillus</i> .....	9
1.4.1	Druhový koncept.....	9
1.4.2	Polyfázický přístup .....	10
1.4.3	Moderní metody nalezení druhových hranic .....	12
2	Metodika.....	15
2.1	Zdroje izolátů.....	15
2.2	Kultivace a fotodokumentace .....	15
2.3	Mikromorfologie .....	19
2.4	Růst v osmotickém gradientu .....	20
2.5	Molekulárně fylogenetická analýza .....	20
2.5.1	Získání dat .....	20
2.5.2	„Objevení“ druhů (species discovery) .....	23
2.5.3	Druhový strom (species tree) .....	25
2.5.4	„Potvrzení“ druhů (species validation) .....	25
3	Výsledky .....	27
3.1	Molekulárně fylogenetická analýza.....	27
3.1.1	Alignment .....	27
3.1.2	„Objevení“ druhů (species discovery) .....	27
3.1.3	Druhový strom (species tree) .....	36
3.1.4	„Potvrzení druhů“ (species validation) .....	38
3.2	Mikromorfologie .....	39

3.3	Růst v osmotickém gradientu .....	43
3.4	Další způsoby rozlišení druhů .....	47
3.5	Vnitrodruhová fenotypová variabilita.....	48
3.6	Shrnutí analýzy.....	48
4	Diskuze .....	53
4.1	Molekulárně fylogenetická analýza.....	53
4.1.1	„Objevení druhů“ (species discovery) .....	53
4.1.1	Druhy zastoupené jediným izolátem (singleton species) .....	55
4.1.2	„Potvrzení druhů“ (species validation) .....	55
4.2	Mikromorfologie .....	57
4.3	Schopnost růstu v osmotickém gradientu.....	57
4.4	Starý a nový koncept sekce <i>Restricti</i> .....	58
5	Závěr .....	61
6	Citovaná literatura .....	62
7	Obrazová příloha.....	68

# 1 Úvod

## 1.1 Osmofilní houby

### 1.1.1 Terminologie

Houby, které přímo vyžadují ke svému růstu sníženou vodní aktivitu substrátu ( $a_w < 1$ ), nebo dosahují při nízké vodní aktivitě nejvyšší rychlosti růstu, jsou označovány jako osmoofilní, halofilní, nebo xerofilní, podle způsobu snížení vodní aktivity. Jako osmoofilní se označují houby rostoucí v prostředí, kde je vodní aktivita snížena rozpuštěnými osmoticky aktivními látkami. Halofilní je specifické označení pro organismy žijící v prostředí, kde je osmoticky aktivní látkou NaCl. Jako xerofilní lze označit organismy rostoucí v prostředí s nedostatkem vody. Dále jsou používány termíny osmo-, halo- a xerotolerantní. Tak se označují houby, které dokáží růst v podmínkách se sníženou vodní aktivitou, ale rychleji rostou, když je vodní aktivita substrátu maximální ( $a_w = 1$ ). Rod *Aspergillus* zahrnuje velký počet osmoofilních druhů zejména v sekcích *Restricti*, *Aspergillus* a *Cremeri*.

### 1.1.2 Využití osmotolerance v taxonomii

Schopnost růstu při určité hodnotě vodní aktivity substrátu je poměrně stabilním znakem, který může být využit v taxonomii. Bylo publikováno již několik studií, ve kterých byly blízce příbuzné druhy rozlišeny na základě schopnosti, nebo neschopnosti růstu při určité vodní aktivitě média (Zalar *et al.* 2005, Kobayashi *et al.* 2012, Hubka *et al.* 2013)

## 1.2 Rod *Aspergillus*

*Aspergillus* je jedním z nejvýznamnějších rodů v celé říši *Fungi*. Jeho zástupci se vyskytují kosmopolitně a mnoho z nich má pozitivní, nebo negativní význam pro člověka. Jedná se o druhy znehodnocující potraviny, produkující mykotoxiny, ale také oportunní patogeny zvířat a člověka (de Hoog *et al.* 2009). Na druhou stranu mnoho druhů je využíváno v biotechnologii, farmacii a potravinářství díky produkci významných metabolitů (enzymů, organických kyselin, antibiotik a jiných farmak) (Ward *et al.* 2006).

## 1.3 Sekce *Restricti*

Skupinu *Aspergillus restrictus* („*A. restrictus* group“) zavedli Raper a Fennell (1965) a zahrnovala pět anamorfních druhů, které byly v předchozích studiích klasifikovány jako zástupci skupiny *A. glaucus* (v současnosti sekce *Aspergillus*,

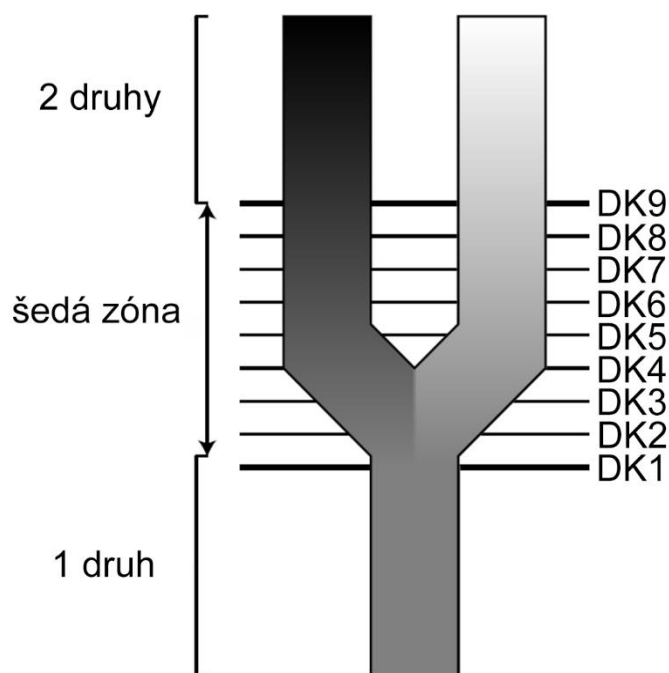


dříve také označovaná podle pohlavního stádia *Eurotium*) (Thom et Raper 1945). Klasifikaci do sekcí u rodu *Aspergillus* zavedli Gams *et al.* (1985), včetně sekce *Restricti*. Podle poslední studie, kterou provedl Peterson (2008), patří do sekce 6 anamorfních (asexuálních) druhů a homothalický druh *A. halophilicus*. Všechny druhy patří mezi osmofilní a jejich význam je především ve znehodnocování potravin, krmiva a osiva (Pitt et Hocking 2009). Také se jedná o spolupůvodce tzv. syndromu nemocných budov (sick building syndrome) (Schwab et Straus 2004). V minulosti byly popsány případy kontaminace a znehodnocení optických přístrojů (Ohtsuki 1962). Nejedná se o významné producenty mykotoxinů, ale svým růstem na substrátech s nízkou vodní aktivitou mohou tyto druhy vytvářet podmínky pro jiné mykotoxinogenní houby (Hubka *et al.* 2013). I v sekci *Restricti* se vyskytují druhy, které jsou využívány v biotechnologii. Polyextremofilní  $\alpha$ -amyláza nalezená u *A. penicilliioides* je používána jako detergent (Ali *et al.* 2015) a ribotoxin restrictocin produkovaný druhem *A. restrictus* dokáže inhibovat virus HIV-1 (Yadav et Batra 2015). Očekávat se dá nalezení i dalších enzymů a bioaktivních látek s potenciálem k využití v biotechnologii a farmakologii. V sekci *Restricti* byla tato oblast zatím velmi málo prozkoumána.

## 1.4 Taxonomie rodu *Aspergillus*

### 1.4.1 Druhový koncept

Až do současné doby bylo navrženo kolem 30 druhových konceptů (Frankham *et al.* 2012). Nejznámějšími jsou biologický, morfologický, ekologický a fylogenetický druhový koncept. Každý koncept používá jiný způsob rozdělení jedinců do druhů (species criterion). Přestože často bývají zdůrazňovány rozdíly mezi jednotlivými druhovými koncepty (Hey 2006), De Queiroz (2007) naopak poukazuje na to, že rozdíl je pouze v tom, v jaké fázi speciace jsou jednotlivé koncepty schopny rozdělit populace na 2 druhy. Rozdíly, které koncepty hledají, se totiž v průběhu speciace vyskytují postupně. Je tedy logické, že při použití fylogenetického druhového konceptu nalezneme více druhů, než kdybychom použili morfologický druhový koncept, protože ke změnám v morfologii dochází téměř vždy až po delším časovém úseku než ke změnám v genomu, ke kterým dochází okamžitě po přerušení genového toku. Schematicky je tento jev znázorněn na obrázku 1.



**Obrázek 1.** Nákres představuje rozdělení jednoho druhu (jedné fylogenetické linie) do dvou. Stínování znázorňuje hromadění rozdílů mezi vznikajícími druhy a vodorovné čáry označují vytvoření znaku pro rozlišení různými druhovými kritérii (species criterion). Před vznikem prvního rozdílu všechny koncepty rozliší pouze jeden druh, po vzniku posledního všechny odhalí 2 druhy. Mezi těmito dvěma stavy však bude docházet k neshodám mezi druhovými koncepty, protože každý používá jiná kritéria pro rozdělení linie na 2 druhy upraveno podle De Queiroz (2007).

#### 1.4.2 Polyfázický přístup

Standardem u taxonomických studií rodu *Aspergillus* se stal tzv. polyfázický přístup (Samson *et al.* 2007). Tento přístup spočívá v kombinaci několika druhových konceptů. Cílem je tedy získat co nejvíce dostupných dat o každém druhu a najít mezi nimi konsenzus. Zejména se jedná o sekvence několika genů, makro- a mikromorfologická měření, fyziologická data, spektrum exometabolitů, informace o ekologii a případně schopnost křížení s opačně laděnými izoláty. V ideálním případě by měly být druhy podpořeny všemi kritérii. Z výše uvedeného je však zřejmé, že k takové situaci v praxi nedochází. Autor studie si tedy vždy musí vybrat, které komponenty polyfázického přístupu upřednostní. Nejčastěji je dnes upřednostňován fylogenetický druhový koncept, u kterého by nemělo docházet ke konfliktu mezi daty založenými na několika nezávislých genetických markerech (Frisvad *et al.* 2005, Balajee *et al.* 2006, Goncalves *et al.* 2012).

#### 1.4.2.1 Biologický druhový koncept u rodu *Aspergillus*

Použití biologického druhového konceptu u rodu *Aspergillus* má několik úskalí. Zaprvé existuje velký počet druhů, jejichž pohlavní stádium není známo. Tyto druhy byly dříve považovány za asexuální, dnes se předpokládá, že jsou spíše heterotalické (pro vytvoření pohlavního stádia musí dojít ke kontaktu s opačně laděným sexuálním partnerem). To zřejmě platí pro všechny druhy v sekci *Restricti* kromě druhu *A. halophilicus*.

Zadruhé v případě provedení křížících pokusů mezi opačně laděnými izoláty může docházet i k tvorbě pohlavního stádia mezi geneticky vzdálenými izoláty reprezentujícími odlišné druhy (Nováková *et al.* 2014). Je pravděpodobné, že k takovému křížení dochází pouze v laboratorních podmínkách a navíc se předpokládá, že fitness potomků bude výrazně snížena. Tento předpoklad však zatím nebyl u hub dostatečně studován. Průkaz mezidruhových hybridů a testování jejich fitness v několika generacích je časově náročný, což limituje aplikaci biologického konceptu u rodu *Aspergillus* i dalších hub.

#### 1.4.2.2 Fylogenetický druhový koncept u rodu *Aspergillus*

V nejnovějších studiích bývají druhové hranice u rodu *Aspergillus* většinou určeny především na základě molekulárních dat, tedy s využitím fylogenetického druhového konceptu, který ale může mít různé podoby. Nejčastěji využívaným přístupem je rozdělení druhů na základě genealogické konkordance - GCPSR (genealogical concordance phylogenetic species recognition) (Dettman *et al.* 2003).

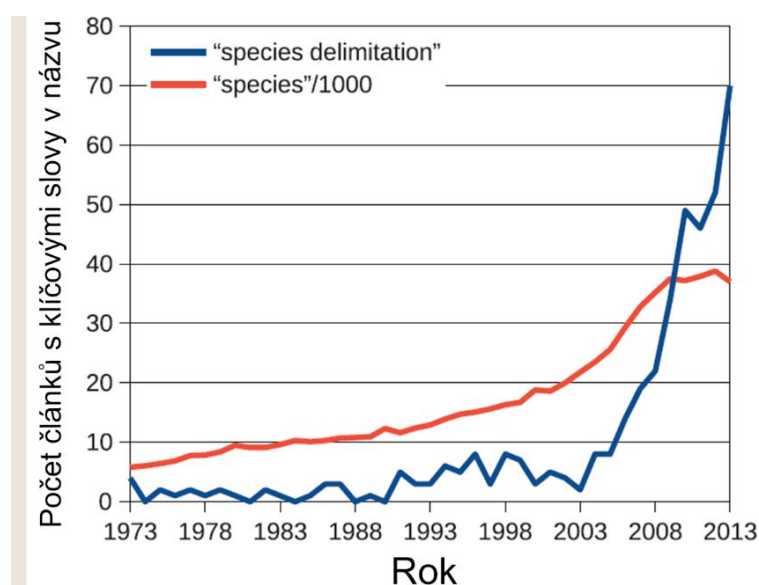
Od každého izolátu jsou získány sekvence několika genů. Úseky DNA běžně používané v taxonomii rodu *Aspergillus* jsou části ribozomální DNA – ITS (internal transcribed spacer) a LSU (large subunit, 28S), dále části genů pro  $\beta$ -tubulin (*benA*), kalmodulin (*CaM*), druhou největší podjednotku RNA polymerázy (*RPB2*), aktin (*Act*) a v novějších studiích také podjednotka DNA helikázy (součást komplexu Minichromosome maintenance complex) (*Mcm7*) a faktor pro maturaci ribozomu (*Tsr1*).

Pro každý z těchto úseků DNA je následně vytvořen jednogenový strom a také tzv. konkatenovaný strom složený ze všech úseků. Nejčastěji užívanými metodami jsou maximum likelihood (ML) a bayesovská analýzy (BA). Jako fylogenetický druh může být označen clade, který má ve většině jednogenových stromů signifikantní statistickou podporu (hodnota bootstrapu u ML je větší než 80% a hodnota posteriorní pravděpodobnosti u BA je větší než 0,95) a zároveň v žádném jednogenovém stromě není signifikantně podpořený clade, který je s daným cladem v rozporu (Dettman *et al.* 2003, Dettman *et al.* 2006).

### 1.4.3 Moderní metody nalezení druhových hranic

#### 1.4.3.1 *Renesance delimitace druhů*

Se všeobecným rozšířením sekvenace DNA a s tím souvisejícím nahromaděním molekulárních dat dochází v současné době k rozvoji metod delimitace druhů založených na multigenové analýze. Flot (2015) znázornil tento trend zobrazením růstu počtu článků s výrazem „species delimitation“ v názvu (obr. 2). Z obrázku vidíme, že počet článků obsahujících výraz „species delimitation“ roste v posledních letech výrazně rychleji, než počet článků obsahujících v názvu pouze termín „species“. Termín renesance druhové delimitace použili poprvé Sites a Marshall (2003) v souvislosti s vývojem nových metod pro rozdělení do druhů. Tento trend pokračuje do současnosti a další metody pro delimitaci druhů vznikají každý rok (Fujisawa *et al.* 2016).



**Obrázek 2.** Historický trend v počtu článků zahrnujících ve svém názvu slova „species“ a „species delimitation“ v letech 1973-2015. Pro usnadnění porovnání trendů byl počet článků se slovem „species“ v názvu vydělen 1000 upraveno podle Flot (2015).

#### 1.4.3.2 *Model mnohodruhové koalescence (multispecies coalescent model)*

Pro nalezení druhových hranic jsou v poslední době vytvářeny a stále častěji využívány metody založené na modelu mnohodruhové koalescence (MSC model) (Kingman 1982). Spolu s rozšířením multigenových analýz bylo zjištěno, že fylogeneze založená na konkatenovaných alignmentech různých genů (spojení alignmentů sekvencí různých lokusů do jednoho souboru a vytvoření jednoho fylogenetického stromu na jejich základě) není vhodnou metodou pro analýzu několikagenových (mnohogenových) datasetů. V posledních letech bylo vytvořeno několik programů pro objasnění evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy, neboli vytvoření tzv. druhového stromu. Některé programy vycházejí z přístupu maximum likelihood, např. STEM (Kubatko *et al.* 2009), GLASS (Liu *et al.* 2009),

STELLS (Wu 2012), jiné z bayesovského přístupu, např. BUCKy (Larget *et al.* 2010), BEST (Liu 2008), nebo ze všech nejpoužívanější \*BEAST (Heled et Drummond 2010), všechny jsou však založeny na MSC modelu (vysvětlení viz níže). Opakovaně bylo prokázáno, že tyto metody poskytují přesnější rekonstrukci fylogeneze než vytvoření stromu z konkatenovaného datasetu (Degnan et Rosenberg 2006, Heled et Drummond 2010, Rosenberg 2013). Kubatko a Degnan (2007) prokázali existenci tzv. anomální zóny, ve které konkatenace vede k nesprávnému druhovému stromu a s přidáváním dalších lokusů podpora pro toto nesprávné řešení pouze roste. Tato anomální zóna se vztahuje k délce vnitřních větví stromu (tzn. časem mezi speciálními událostmi) a velikostí ancestrálních i současných populací jednotlivých druhů. Mezi topologiemi jednogenových stromy dochází ke konfliktům díky nezávislému vývoji jednotlivých úseků DNA. Nejčastějším důvodem konfliktu mezi jednogenovými stromy je tzv. nekompletní třídění linií (incomplete lineage sorting – ILS), ale existují i další důvody konfliktů, např. horizontální genový transfer, nebo genová duplikace.

Konkatenace sekvencí nebere v potaz žádný z těchto jevů, ani v případě tzv. partition analýzy, při které je alignment rozdělen na části s jednotlivými geny a pro každý je zvlášť určen model evoluce. Jak moc se od sebe jednotlivé lokusy použité v analýze navzájem liší a jak moc jejich konkatenace ovlivní výsledek následné analýzy, umožňuje zhodnotit například ILD (incongruence length difference) test (Barker et Lutzoni 2002), nebo některé další testy (Huelsenbeck et Bull 1996, Leigh *et al.* 2008), které vždy porovnávají jednolokusové stromy.

#### *1.4.3.3 Průběh analýzy založené na MSC modelu*

Studie provádějící analýzu metodami založenými na MSC modelu většinou postupují podle doporučení Carstense *et al.* (2013). Analýza je rozdělena do 3 fází. V první fázi je vytvořena hypotéza o počtu druhů a příslušnosti jedinců do těchto druhů. K tomu jsou využívány klastrovací metody. K tomuto prvnímu kroku mohou být využity sekvence DNA, ale i jiná data např. mikrosatelity, jednonukleotidové polymorfismy (SNP) atd. Metody využívající sekvence DNA se dále rozdělují na distanční (distance-based) a založené na stromech (tree-based) (Flot 2015, Fontaneto *et al.* 2015). Většina těchto metod pracuje pouze s jednolokusovými daty, výjimku tvoří Stacey (Jones 2016), doplněk programu BEAST2 (Bouckaert *et al.* 2014), který provádí primární rozdělení do druhů na základě multigenového datasetu. Je doporučováno použít v první fázi více metod a z výsledků vytvořit konsenzus. V současné době se již začínají vyskytovat publikace, které mezi sebou porovnávají účinnost jednotlivých metod, zatím však není jednoznačné, jestli jsou některé metody výrazně efektivnější než jiné (Tang *et al.* 2014, Schwarzfeld et Sperling 2015).

Druhou fází je vytvoření druhového stromu. Také v tomto případě je možné vybírat z různých dostupných programů, ale nejpoužívanějším je \*BEAST (Heled et Drummond 2010). Vstupními daty jsou v tomto případě pouze sekvence DNA z několika lokusů dále je třeba zadat rozdělení izolátů do potenciálních druhů.

Třetí fáze spočívá ve výpočtu statistické podpory pro potenciální druhy za předpokladu platnosti druhového stromu, získaného v druhé fázi. Pro tuto část je nejčastěji využíván program BP&P (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography). Tento program vyžaduje nastavení 2 parametrů.  $\tau$  pro časové rozpětí mezi speciálními událostmi a  $\theta$  pro velikost populací současných a ancestrálních druhů. Hodnoty těchto parametrů většinou nejsou známy, z toho důvodu se většinou analýza provádí v několika opakováních s několika různými nastaveními, nejčastějšími kombinacemi jsou velké populace/dávnné rozdělení, malé populace/nedávnné rozdělení a velké populace/nedávnné rozdělení (Camargo *et al.* 2012, Grummer *et al.* 2014). Program BP&P testuje všechny možné scénáře se zadaným a nižším počtem druhů (zkouší druhy pouze sloučit, ne rozdělit na víc), takže má smysl porovnat modely s počtem druhů navrženým ve fázi 1 a modely s více druhy.

Přestože už byly tyto metody aplikovány na různé organismy, u hub jsou zatím minimálně používány. Tato studie je první případ použití u rodu *Aspergillus*.

## 2 Metodika

### 2.1 Zdroje izolátů

Pro práci byly použity izoláty z několika sbírek hub z různých zemí Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, IL, USA (NRRL), Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nizozemsko (CBS), Working collection of the department of Applied and Industrial Mycology housed at CBS (DTO), Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Scientific Institute of Public Health, Brusel, Belgie (IHEM), Culture Collection of Fungi, katedra botaniky, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika (CCF) a dále kmeny poskytnuté Ž. Jurjevičem (EMSL Analytical, New Jersey, USA). Kompletní seznam včetně původu všech izolátů je uveden v tabulce 1.

### 2.2 Kultivace a fotodokumentace

Kmeny byly kultivovány na běžných médiích agar CYA (Czapek Yeast Autolysate) (Pitt 1979), MEA (Malt Extract agar) (Samson *et al.* 2010) a na médiích s přidanými osmoticky aktivními látkami (NaCl nebo sacharóza) CY20S (CYA 20 % sucrose agar) (Klich 2002), M40Y (Harrold's agar), MEA10 % NaCl (Malt Extract agar 10 % NaCl), M60Y (Harrold's agar 60 % Sucrose) (Hubka *et al.* 2013) a DG18 (Dichloran 18% Glycerol agar) (Hocking et Pitt 1980). Kultivace probíhala 14 dní, ve tmě, při teplotě 25 °C, na médiích CY20S a M60Y byly izoláty kultivovány i při teplotách 30 °C a 37 °C. Specifický druh *Aspergillus halophilicus* byl kultivován 30 dní na médiu CZ70S (Czapek agar 70 % sucrose) (Christensen *et al.* 1959) při teplotě 25 °C, teprve poté bylo možné zdokumentovat jeho morfologii.

Makromorfologické fotografie kolonií byly pořízeny fotoaparátem Nikon D5100. Mikromorfologie byla zdokumentována stereomikroskopem Zeiss SteREO Discovery.V20 s programem Nikon NIS-elements D v. 4.0 a mikroskopem Olympus BX-51 s fotoaparátem Olympus DP72 a Nomarského kontrastem. Fotografie byly zpracovány v programu Adobe Photoshop CS6. Skenovací elektronová mikroskopie byla provedena na mikroskopu JEOL-6380 LV (JEOL Ltd. Tokio, Japonsko). Části kolonií byly nafixovány pomocí par oxidu osmičelého při teplotě 5-10 °C po dobu jednoho týdne a pozlaceny pomocí přístroje Bal-Tec SCD 050. Vzorby byly pozorovány s nastavením velikosti stopy (spot size) 40 μm a urychlovacího napětí (accelerating voltage) 25 kV. Pro dokumentaci mikromorfologických znaků byly použity kultury rostoucí 14 dní na médiu M40Y při teplotě 25 °C.

**Tabulka 1.** Seznam izolátů použitých v práci.

Druh/kód izolátu	substrát	lokalita	rok izolace
<b><i>A. restrictus</i></b>			
ZJ 1633	ovzduší nemocnice	USA, New Jersey	2012
ZJ 1416	ovzduší domu	USA, Alabama	2010
ZJ 1379	ovzduší domu	Bermudy	2010
ZJ 2206	ovzduší školy	USA, New Jersey, Sickerville	2013
NRRL 25882	krmivo dobytka	USA	1984
DTO 065-C7	kukuřice	Indonésie	neznámý
ZJ 2652	baseballová rukavice	USA, Illinois, O'fallon	2014
NRRL 154 <sup>T</sup>	látka	Velká Británie	1928
ZJ 2429	pořadač na papíry v látkových deskách	USA, New Jersey	2014
IHEM 818	ovzduší domu	Belgie, Estinnes-au-Mont	neznámý
ZJ 1611	povlečení	USA, Severní Karolína	2012
CCF 3364	houba <i>Corallocytostroma ornicopreoides</i>	Česká republika, Praha	2003
US 2b			
ZJ 2906	batoh na dítě	USA, Kalifornie, San Diego	2015
ZJ 1675	balicí materiál	USA, Maryland	2012
IHEM 2121	prach z matrace	Belgie, Antverpy	neznámý
NRRL 25862	kontaminace	USA, Illinois	1975
IHEM 2477	ovzduší kanceláře	Belgie, Brusel	neznámý
IHEM 2373	ovzduší kanceláře	Belgie, Brusel	neznámý
<b><i>A. caesiellus</i></b>			
NRRL 25810	látka	Panama	1945
DTO 026-C7	neznámý	Německo	2007
DTO 025-I4	ovzduší domu	Německo	2006
ZJ 1614	ovzduší	USA, Delaware	2012
ZJ 1499	ovzduší domu	USA, Delaware	2011
ZJ 1650	ovzduší obchodního domu	USA, Delaware	2012
NRRL 5061 <sup>T</sup>	neznámý	Japonsko	neznámý
NRRL 25861	neznámý	Indie, Gorkapus	>1974
NRRL 25815	obuv	USA, Florida	1944
<b><i>A. caesiellus</i> „sp. 2“</b>			
NRRL 25824	neznámý	USA, Washington, DC	1956
ZJ 2310	ovzduší domu	USA, Kalifornie	2005
<b><i>A. conicus</i></b>			
ZJ 1649	ovzduší obchodního domu	USA, Delaware	2012
ZJ 1318	ovzduší domu	USA, Idaho	2010
ZJ 1490	ovzduší domu	USA, Kalifornie	2011
NRRL 25881	neznámý	USA, New York	1975
NRRL 149 <sup>T</sup>	neznámý	neznámý	1924



ZJ 2549	ovzduší kanceláře	Portoriko, Bayamon	2014
ZJ 2217	ovzduší domu	USA, Pensylvánie, West Chester	2013
IHRM 16531	dřevěná socha	Belgie, Braine-l'Alleud	neznámý
CCF 4042			
NRRL 25848	asfaltové šindele	USA, Illinois, Chicago	1959
DTO 231-C3	neznámý	Nizozemsko, Zwartewaal	2012
IHRM 20709	sladkosti	Belgie	neznámý
DTO 110-F5	ovzduší domu	Dánsko, Kodaň	2009
DTO 110-C5	ovzduší koupelny	Dánsko, Kodaň	2009
DTO 017-B9	ovzduší domu	Nizozemsko, Eindhoven	2006
<b>A. conicus „sp. 2“</b>			
DTO 231-C1	neznámý	Nizozemsko, Zwartewaal	2012
DTO 086-D1	ovzduší domu	Nizozemsko, Den Bosch	2008
DTO 231-B9	neznámý	Nizozemsko, Zwartewaal	2012
IHEM 6549	prach z matrace	Belgie, Brusel	neznámý
DTO 079-F2	tapeta	neznámá	2008
ZJ 1316	ovzduší domu	USA, Idaho	2010
<b>A. conicus „sp. 3“</b>			
NRRL 157	neznámý	USA	1939
NRRL 145	kukuřice	USA, Maryland	1917
DTO 220-B2	ovzduší	Nizozemsko, Tilburg	2012
DTO 113-E7	ovzduší pekárny	Nizozemsko, Tilburg	2009
DTO 147-E2	ovzduší domu	Maďarsko	2009
DTO 161-B7	povrch sýra	Nizozemsko	2011
<b>A. gracilis</b>			
NRRL 4962 <sup>T</sup>	neznámý	neznámá	neznámý
ZJ 2920	batoh na dítě	USA, Kalifornie, San Diego	2015
ZJ 2922	batoh na dítě	USA, Kalifornie, San Diego	2015
ZJ 2923	batoh na dítě	USA, Kalifornie, San Diego	2015
<b>A. vitricola</b>			
NRRL 5125 <sup>T</sup>	čočky mikroskopu	Japonsko	1962
DTO 123-B2	ovzduší domu	neznámá	2010
DTO 122-I4	ovzduší domu	neznámá	2010
DTO 122-I5	ovzduší domu	neznámá	2010
<b>A. vitricola „sp. 2“</b>			
ZJ 2462	desky v kanceláři	Trinidad a Tobago, Macoya	2014
ZJ 2463	desky v kanceláři	Trinidad a Tobago, Macoya	2014
ZJ 2464	desky v kanceláři	Trinidad a Tobago, Macoya	2014
ZJ 2465	desky v kanceláři	Trinidad a Tobago, Macoya	2014
ZJ 1483	ovzduší domu	USA, Kalifornie	2011
ZJ 1812	knihovna	USA, Louisiana	2012
ZJ 1813	knihovna	USA, Louisiana	2012
ZJ 1317	ovzduší domu	USA, Idaho	2010

ZJ 2305	ovzduší kuchyně	USA, Jižní Karolína, Summerville	2014
ZJ 2442	pořadač na papíry v látkových deskách	USA, New Jersey	2014
<b><i>A. halophilicus</i></b>			
NRRL 2739 <sup>T</sup>	sušená kukuřice	USA, Minnesota, St. Paul	1957
DTO 271-F4	neznámý	neznámá	2013
<b><i>A. penicilliioides</i></b>			1957
NRRL 4548 <sup>T</sup>	lidská kůže	Brazílie, Recife	1958
NRRL 25834	hrách	USA, Minnesota, St. Paul	1957
CCF 2666	kožená obuv	Česká republika, Zlín	1990
ZJ 2651	baseballová rukavice	USA, Illinois, O'fallon	2014
NRRL 25835	pšenice	USA, Minnesota, St. Paul	1957
DTO 267-A9	prach v domě	Mikronésie	neznámý
ZJ 2909	batoh na dítě	USA, Kalifornie, San Diego	2015
NRRL 25816	neznámý	USA, Severní Karolína, Durham	1952
ZJ 2430	pořadač na papíry v látkových deskách	USA, New Jersey	2014
IHEM 2330	obilná semena	Francie	neznámý
IHEM 2476	ovzduší kanceláře	Belgie, Brusel	neznámý
CCF 3282	pečivo s čokoládovou polevou	Česká republika, Praha	2002
ZJ 2441	pořadač na papíry v látkových deskách	USA, New Jersey	2014
DTO 281-A7	kůže	Nizozemsko	2013
NRRL 4550	lidská kůže	Brazílie, Recife	1958
NRRL 25870	type isolate of Ciferri's Pedaellia elegans	neznámý	neznámý
NRRL 4553	lidská kůže	Brazílie, Recife	1958
NRRL 25826	ječmen	USA, Minnesota, St. Paul	1957
NRRL 25825	ječmen	USA, Minnesota, St. Paul	1957
NRRL 25830	izolační deska	USA, Minnesota, St. Paul	1957
ZJ 2440	pořadač na papíry v látkových deskách	USA, New Jersey	2014
NRRL 25822	sušená kukuřice	USA, Minnesota, St. Paul	1954
NRRL 25820	sušená kukuřice	USA, Minnesota, St. Paul	1954
<b><i>A. penicilliioides</i></b> <b>„sp. 2“</b>			
DTO 316-B5	neznámý	Nizozemsko	2014
DTO 316-A7	zubařské křeslo	Nizozemsko	2014
DTO 316-A8	pneumatika	Nizozemsko	2014
DTO 316-A9	neznámý	Nizozemsko	2014
DTO 316-B4	sklo z vitríny	Nizozemsko	2014
DTO 073-H6	zed' archivu	Nizozemsko, Tilburg	2008

<b>A. <i>penicilliioides</i> „sp. 3“</b>			
NRRL 25873	papír	USA, Gergie, Athens	1987
NRRL 25874	papír	USA, Gergie, Athens	1987
DTO 257-G5	čaj	Čína	neznámý
<b>A. <i>penicilliioides</i> „sp. 4“</b>			
ZJ 1272	ovzduší domu	USA, Idaho	2009
CCF 3112	kožená obuv	Česká republika, Zlín	1998
ZJ 1362	ovzduší	USA, Idaho	2010
ZJ 1314	ovzduší domu	USA, Idaho	2010
ZJ 2548	ovzduší kanceláře	Portoriko, Bayamon	2014
ZJ 1313	ovzduší domu	USA, Idaho	2010
IHEM 22696	prach z koberce	Belgie Brusel	neznámý
ZJ 885	ovzduší domu	USA, Florida	2008
ZJ 2525	ovzduší	Portoriko, Bayamon	2014
NRRL 25852	biopsie plic	USA, Jižní Karolína, Charleston	1965
ZJ 2526	ovzduší	Portoriko, Bayamon	2014
NRRL 25878	biopsie plic	USA, Georgie, Chamblee	1950
<b>A. <i>penicilliioides</i> „sp. 5“</b>			
ZJ 1315	ovzduší domu	USA, Idaho	2010
NRRL 25866	katsuobushi	Japonsko, Tokio	1967
NRRL 25867	katsuobushi	Japonsko, Tokio	1967
ZJ 2918	batoh na dítě	USA, Kalifornie, San Diego	2015
NRRL 25821	sušená kukuřice	USA, Minnesota, St. Paul	1954

## 2.3 Mikromorfologie

Z každého druhu bylo vybráno alespoň pět izolátů (pokud byly k dispozici), u kterých bylo provedeno měření mikromorfologických znaků. Tyto izoláty byly kultivovány 14 dní při teplotě 25 °C na médiu M40Y. Následně byly u každého měřeny tyto morfologické znaky: z mladé části kolonie (okraj) délka a šířka konidií, šířka stopky a měchýřku konidioforů a délka fialid (konidiogenních buněk), ze staré části kolonie (střed) délka a šířka konidií, šířka stopky a měchýřku konidioforů. Od každého znaku bylo u jednotlivých izolátů měřeno nejméně 20 hodnot. Se získanými daty byla v programu R (R Core Team 2015) s nainstalovanými doplňky MASS (Venables et Ripley 2002), ggplot2 (Wickham 2009) a ellipse provedena lineární diskriminační analýza. Izoláty byly rozděleny do skupin na základě jejich rozdělení do druhů v molekulárně fylogenetické analýze (viz kapitola 2.3 a 3.1).

## 2.4 Růst v osmotickém gradientu

Z každého druhu bylo vybráno pět izolátů, pokud byly k dispozici, u kterých bylo provedeno měření rychlosti růstu v osmotickém gradientu. Každý izolát byl kultivován 14 dní při teplotě 25 °C na 6 různých médiích s klesající vodní aktivitou. Jako základní médium byl zvolen Malt Extract Agar (MEA), do kterého byl přidáván chlorid sodný pro snížení vodní aktivity. Seznam médií je v tabulce 3.

**Tabulka 3.** Média použitá pro měření rychlosti růstu v osmotickém gradientu

Médium	Koncentrace NaCl
MEA	0
MEA 5% NaCl	50 g/l
MEA 10% NaCl	100 g/l
MEA 15% NaCl	150 g/l
MEA 20% NaCl	200 g/l
MEA 25% NaCl	250 g/l

U každého izolátu byla třikrát změřena velikost kolonie (extension rate) a tato hodnota byla zprůměrována. Výsledná data byla zpracována v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015), s nainstalovaným doplňkem ggplot2 (Wickham 2009).

## 2.5 Molekulárně fylogenetická analýza

### 2.5.1 Získání dat

#### 2.5.1.1 *Izolace DNA*

DNA byla vyizolována z kultur rostoucích 7 dní na médiu M40Y pomocí sady ArchivePure DNA Yeast & Gram-+ Kit (5 PRIME Inc., Gaithersburg, Maryland) podle pokynů výrobce. Kvalita vyizolované DNA byla zkontrolována na spektrofotometru Nanodrop ND-1000. Většinu DNA vzorků izolovala RNDr. Milada Chudíčková.

#### 2.5.1.2 *PCR amplifikace*

Pro analýzu byly vybrány 4 úseky DNA vzhledem k tomu, že již byly s úspěchem použity u jiných sekcí rodu *Aspergillus* a příbuzných rodů. Jedná se o části sekvencí tří proteiny-kódujících genů, a sice pro  $\beta$ -tubulin (*benA*), kalmodulin (*CaM*) a velkou podjednotku RNA polymerázy II (*RPB2*) a oblast ribozomální DNA (rDNA) obsahující oblasti ITS1 (internal transcribed spacer), 5,8S, ITS2 a

část velké ribozomální podjednotky (LSU, nebo také 28S rDNA). Primery použité pro amplifikaci jednotlivých úseků jsou uvedeny v tabulce 2. Amplifikace úseku RPB2 byla často neúspěšná s běžně používanými primery (fRPB2-5F a fRPB2-7CR), proto byly navrženy specifické primery pro sekci *Restricti* (fRPB2ResF100, fRPB2ResR950). Primery byly navrženy ručně na základě alignmentu několika sekvencí získaných amplifikací s konzervativními primery a kontrola jejich kvality (kompatibilita teplot tání, vyloučení tvorby vlásenek a dimerů) byla provedena v programu OligoAnalyzer 3.1 na serveru <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.

**Tabulka 2.** Seznam použitých primerů.

Úsek DNA	Přímý primer	Sekvence (5'–3')	Zdroj
benA	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	(Glass et Donaldson 1995)
	T10	ACGATAGGTTACCTCCAGAC	(O'donnell et Cigelnik 1997)
CaM	CF1L	GCCGACTCTTTGACYGARGAR	(Peterson 2008)
	CF1M	AGGCCGAYTCTYTGACYGA	(Peterson 2008)
	Cmd5	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	(Hong <i>et al.</i> 2006)
RPB2	fRPB2 5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	(Liu <i>et al.</i> 1999)
	fRPB2ResF100	TGAARTAYGCICTTGACYAC	nově navržený
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White <i>et al.</i> 1990)
Úsek DNA	Zpětný primer	Sekvence (5'–3')	Zdroj
benA	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	(Glass et Donaldson 1995)
CaM	CF4	TTTYTGATCATRAGYTGGAC	(Peterson 2008)
	Cmd6	TTTYTGATCATRAGYTGGAC	(Hong <i>et al.</i> 2006)
RPB2	fRPB2 7CR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	(Liu <i>et al.</i> 1999)
	fRPB2ResR950	CARTGYGTCCADGTRTGKGC	nově navržený
ITS	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	(O'donnell 1993)

Reakční směsi pro amplifikaci byly připraveny v objemu 25 µl v následujícím složení:

1,2 µl genomové DNA izolátu (100 ng/µl)

5 µl pufru (MyTaq Bioline 5x, obsahující deoxynukleotidy a MgCl<sub>2</sub>)

2 µl (10pmol/µl) forward primeru

2 µl (10pmol/µl) reverse primeru

0,25 µl MyTaq DNA polymerázy (Bioline, Londýn, UK)

14,55 µl deionizované vody

Amplifikace probíhala v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf). Pro většinu vzorků byl použit následující program:

94 °C/2 min (1×)

94 °C/30 s, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min (35×)

72 °C/10 min (1×)

V závislosti na použitých primerech byla upravována teplota annealingu v rozsahu od 50 °C do 60 °C.

U problematických vzorků, kde nebyl opakovaně pozorován žádný produkt reakce, byl použit program „touchdown”:

94 °C/2min (1×)

94 °C/30s, 66 °C – 60 °C/45s, 72 °C/1min (5×)

94 °C/30s, 60 °C/45s, 72 °C/45s (30×)

72 °C/10 min (1×)

Výsledek amplifikace byl zkontrolován na elektroforetogramu (1 % agarózový gel obsahující 0.5 µg/ml ethidium bromidu; oboje HiMedia, Bombaj, Indie).

#### *2.5.1.3 Čištění PCR produktů*

Čištění produktů probíhalo srážením ethanolem podle následujícího postupu:

- k 20 µl PCR produktu byly přidány 2 µl 3M octanu sodného a 60 µl 96% ethanolu
- směs byla promíchána a ponechána 20 minut při 4 °C
- následně byla směs centrifugována 30 minut na 2 250 rpm při 4 °C
- supernatant byl vylit a k precipitátu bylo přidáno 175 µl 70% ethanolu
- směs byla centrifugována 15 minut na 2 250 rpm při 4 °C
- supernatant byl vylit a precipitát byl ponechán 10 minut při laboratorní teplotě na vysušení
- nakonec byl produkt přesrážení rozpuštěn v 10 µl deionizované vody

#### 2.5.1.4 Sekvenace

Sekvenování bylo provedeno servisně u společnosti MacroGen Europe (Holandsko). Sekvenace byla vždy provedena oběma koncovými primery použitými při PCR.

#### 2.5.1.5 Úprava sekvencí a tvorba alignmentu

Primární data získaná sekvenací (chromatogramy) byly zobrazeny v programu FinchTV (dostupný online <http://www.geospiza.com/Products/finchview.shtml>) a upraveny v programu Bioedit (Hall 1999). Alignmenty byly vytvořeny programem MAFFT (Kato et Standley 2013) iterativní metodou G-INS na serveru <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>. Následně byly ručně upraveny v programu Aliview (Larsson 2014).

### 2.5.2 „Objevení“ druhů (species discovery)

#### 2.5.2.1 Geneland

Z každého jednogenového alignmentu byly nejprve v programu dnaSP (Librado et Rozas 2009) extrahovány pouze variabilní pozice a následně byly alignmenty upraveny do požadovaného formátu v programu PGD Spider (Lischer et Excoffier 2012). Analýza proběhla v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015) s nainstalovaným doplňkem Geneland (Guillot *et al.* 2005) a s následujícími parametry: pro každý lokus byly zvoleny 4 nezávislé běhy (number of independent runs = 4), každý o délce 100 000 kroků (number of iterations = 100 000, thinning = 100, burn-in = 10 000) a počtem možných populací (K) 4-25, bez použití prostorového modelu (spatial model = false).

#### 2.5.2.2 ABGD (Automatic barcode gap discovery)

Analýza metodou ABGD byla provedena na serveru <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>. Vstupními daty byly matice vzdáleností vytvořené z jednogenových alignmentů v programu MEGA7 (Kumar *et al.* 2016). Počet kroků v analýze byl nastaven na 20, ostatní parametry byly ponechány na základním nastavení (Pmin = 0,001; Pmax = 0,1; X = 1,5).

#### 2.5.2.3 Jednogenové stromy vytvořené bayesovskou metodou

V programu BEAST 2.3.2 (Bouckaert *et al.* 2014) byly vytvořeny jednogenové stromy, které byly základem pro následnou analýzu metodami GMYC, PTP a bGMYC. Délka řetězce byla 20 000 000 generací, burn-in 25 %. Vhodný model evoluce pro každý z alignmentů byl vybrán pomocí bayesovského informačního kritéria (BIC) v programu jModeltest. V programu Tracer 1.6 byly zkontrolovány

hodnoty ESS pro jednotlivé parametry, na jejichž základě lze určit, zda byl řetězec dostatečně dlouhý a výsledky mají výpovědní hodnotu.

#### *2.5.2.4 GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent approach)*

Základem pro analýzu metodou GMYC (Fujisawa et Barraclough 2013) byly jednogenové stromy vytvořené podle kroků popsaných v kapitole 2.3.2.3. Analýza byla provedena metodou single threshold na serveru <http://species.h-its.org/gmyc>.

#### *2.5.2.5 PTP (Poisson Tree Processes model)*

V této analýze byly opět použity dříve vytvořené jednogenové stromy. I pro tuto analýzu byl využit dostupný webový server <http://species.h-its.org/ptp/> se základním nastavením: mcmc řetězec o délce 100 000 generací, hodnota thinning = 100 a hodnota burn-in = 0.1 (10 %).

#### *2.5.2.6 bGMYC (bayesian Generalized Mixed Yule Coalescent approach)*

Základem pro tuto analýzu byl soubor stromů pocházejících z řetězce mcmc v kroku 2.3.3.3. Z celkového souboru 20 000 stromů bylo odstraněno prvních 15 000 a ze zbývajících 5 000 bylo rovnoměrně vybráno 100 stromů pomocí programu LogCombiner. Tento postup byl zopakován pro každý jednogenový alignment. Tyto soubory stromů byly následně analyzovány v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015) s nainstalovaným doplňkem bGMYC (Reid et Carstens 2012). Parametry byly nastaveny standardně podle doporučení autora, délka mcmc řetězce 50 000 generací, burn-in 40 000 (80 %), thinning 100. Hypotézy o počtu druhů byly vytvořeny s konzervativním nastavením hranice pravděpodobnosti 0,5.

#### *2.5.2.7 STACEY*

Hledání mezidruhových hranic s využitím všech 4 genů najednou bylo provedeno v programu BEAST 2.3.2 (Bouckaert *et al.* 2014) s nainstalovaným doplňkem STACEY 1.1.0 (Jones 2016). Vzhledem k výpočetní náročnosti této metody, byl dataset rozdělen na 3 části (druhové komplexy) na základě výsledků předchozích analýz, tyto části korespondovaly se 3 clady, které jsou od sebe výrazně vzdálené. Sekvence druhu *A. halophilicus* byly z této analýzy vynechány, protože nebylo jasné, do které části by měly být přidány kvůli velkým fylogenetickým vzdálenostem od všech zkoumaných druhů. Naopak bylo jisté, že by *A. halophilicus* byl jednoznačně oddělen od všech ostatních druhů, což prokázaly ostatní analýzy. Modely evoluce pro jednotlivé geny byly nastaveny podle výsledků získaných v kroku 2.3.3.3. Délka řetězce byla nastavena na 80 000 000



generací. Každý izolát byl nastaven jako samostatná populace. Ostatní parametry byly nastaveny podle návodu.

Výstup byl zpracován programem SpeciesDelimitationAnalyser.

## 2.5.3 Druhový strom (species tree)

### 2.5.3.1 \*BEAST

Hledání topologie druhového stromu bylo provedeno v programu \*BEAST (Heled et Drummond 2010). Byly provedeny 2 analýzy s odlišným rozdělením izolátů do druhů. V jedné analýze byly izoláty rozděleny na základě výsledků z první fáze (species discovery). V druhém případě byl každý izolát počítán jako samostatný druh. Výsledný strom z druhé analýzy byl použit pro zobrazení výsledků první fáze (species discovery). Modely evoluce pro jednotlivé geny byly nastaveny podle výsledků získaných v kroku 2.3.3.3. Délka řetězce byla nastavena na 80 000 000 generací. Pro velikost populace byla nastavena populační funkce lineární s konstantním kořenem (linear with constant root).

Výsledky analýzy byly zobrazeny pomocí programů Figtree 1.4.2 (Rambaut *et al.* 2014) a Densitree (Bouckaert 2010).

## 2.5.4 „Potvrzení“ druhů (species validation)

### 2.5.4.1 BP&P

V programu BP&P 3.1 (Bayesian phylogenetics and phylogeography) (Yang et Rannala 2010) byla provedena tzv. A10 analýza (hledání optimálního rozdělení izolátů do druhů s předem danou topologií druhového stromu) s oběma algoritmy 0 i 1 podle doporučení autora. Pro analýzu byla použita různá apriorní rozdělení izolátů do předpokládaných druhů na základě analýz z kroku „objevení druhů“ (kapitola 2.3.3), ke kterým byl vždy doplněn příslušný druhový strom, vytvořený v programu \*BEAST (kapitola 2.3.4). Byla vyzkoušena různá nastavení klíčových apriorně nastavovaných hodnot  $\tau$  (čas mezi speciacemi) a  $\theta$  (parametr velikosti populací): ( $\tau = G(1,10)$ ,  $\theta = G(1,10)$ ), ( $\tau = G(1,10)$ ,  $\theta = G(2,2000)$ ) a ( $\tau = G(2,2000)$ ,  $\theta = G(2,2000)$ ) podle doporučení, která uvedli Leache a Fujita (2010).

### 2.5.4.2 GSI (Genealogical sorting index)

Pro analýzu metodou GSI (genealogical sorting index) byly vytvořeny jednogénové stromy metodou maximum likelihood na webovém serveru <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>. Substituční modely pro jednotlivé geny byly opět nastaveny podle výsledků získaných v kroku 2.3.3.3 a byla provedena standardní bootstrapová analýza se 100 replikacemi. Vzhledem k tomu, že metoda GSI nepracuje s délkami větví, byl právě výsledek bootstrapové analýzy použit pro

další práci. V programu R 3.2.3 (R Core Team 2015) s nainstalovaným doplňkem ape (Paradis *et al.* 2004) byl vytvořen konsenzuální strom z bootstrapové analýzy, který byl použit pro výpočet GSI. Analýza byla provedena na webovém serveru <http://www.molecularrevolution.org/software/phylogenetics/gsi> . Stejně jako v předchozím případě byly izoláty rozděleny do předpokládaných druhů na základě analýz z kroku „objevení“ druhů (kapitola 2.3.3). Počet permutací pro výpočet p-hodnoty byl nastaven na 10 000 (maximum).

## 3 Výsledky

### 3.1 Molekulárně fylogenetická analýza

#### 3.1.1 Alignment

Kromě dvou izolátů (DTO 122-I5 a DTO 123-B2), pro které se nepodařilo získat sekvenci pro  $\beta$ -tubulin, byly získány sekvence všech čtyř úseků pro všech 126 izolátů. Z těchto sekvencí byly vytvořeny alignmenty, jejichž délka a počty variabilních pozic jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4.** Délka alignmentu a počet variabilních a parsimonně informativních pozic jednotlivých lokusů.

lokus	délka (počet bazí)	variabilních pozice	parsimonně informativních pozice
benA	505	262 (51,9 %)	248 (49,1 %)
caM	688	270 (39,2 %)	256 (37,2 %)
ITS a LSU	1126	201 (17,9 %)	166 (14,7 %)
RPB2	844	267 (31,6 %)	243 (28,8 %)

Z tabulky 4 je zřejmé, že nejvíce variabilním lokusem je oblast genu pro  $\beta$ -tubulin, naopak nejvíce konzervativním úsekem je ITS a LSU rDNA.

#### 3.1.2 „Objevení“ druhů (species discovery)

Obrázky 3-6 schematicky znázorňují výsledky metod použitých ve fázi objevení druhů (species discovery). V každém obrázku je použit stejný strom, který byl vytvořen v programu BEAST 2.3.2 (Bouckaert *et al.* 2014) s nainstalovaným doplňkem \*BEAST (Heled et Drummond 2010) na základě všech čtyř lokusů. Barevné rozdělení větví ve stromě představuje konečné rozdělení izolátů do druhů na základě všech dostupných dat a je tedy hlavním výsledkem této práce. Tento strom je zobrazen ještě jednou na obrázku 7 ve zvětšené formě pro lepší čitelnost kódů izolátů.

Barevné sloupce na obrázcích 3-6 znázorňují, jakým způsobem daná metoda rozdělila soubor izolátů do druhů. Černé proužky jsou použity pro znázornění potenciálních druhů tvořených pouze jedním izolátem. Sloupec rozdělení druhů metodou Stacey (Jones 2016) je na všech obrázcích stejný, jelikož Stacey pracuje se všemi lokusy najednou. Ostatní sloupce zachycují rozdělení pomocí jednogennových metod a liší se tedy na každém obrázku.

Na obrázku 8 se nachází graf shrnující počty druhů, do kterých byl soubor 126 izolátů rozdělen všemi metodami ve všech lokusech. Metodou s nejstabilnějšími výsledky byl jednoznačně Geneland (Guillot *et al.* 2005), který pokaždé dospěl ke stejnému výsledku se šesti druhy. Tento počet byl však výrazně nižší, než k jakému dospěly všechny ostatní metody, a kterému nasvědčovala fenotypová variabilita (viz níže). Naopak ABGD (Puillandre *et al.* 2012) byla metodou s největším rozptylem, kde se počet odhadovaných druhů pohyboval mezi 4 a 25 v závislosti na lokusu. Nejvyšší počet druhů odhadovala metoda PTP (Zhang *et al.* 2013), v průměru 25, naopak nejnižší již zmiňovaný Geneland. Jednogenovou metodou, jejíž rozdělení do druhů se nejvíce přibližovalo výsledkům multigenové metody Stacey (Jones 2016) byla metoda bGMYC (Reid *et al.* 2012). Vzhledem k výrazným odlišnostem od výsledkům ostatních metod, byly výsledky metody Geneland brány s určitou rezervou. Podobně i výsledky metody ABGD nebyly brány zcela v potaz kvůli velmi rozdílným výsledkům pro jednotlivé lokusy.

V rámci **komplexu *A. conicus*** metody nejčastěji rozlišily druhy *A. conicus* s. str., *A. gracilis* a dva nové druhy *A. conicus* „sp. 2“ a *A. conicus* „sp. 3“. K tzv. „oversplittingu“, tedy rozdělení komplexu do příliš mnoha druhů, docházelo nejčastěji při použití lokusu RPB2. Při použití ITS oblasti rDNA byl stabilně nacházen ještě jeden nový druh. Metodou Geneland byl ve všech případech tento komplex rozeznán jako jediný druh.

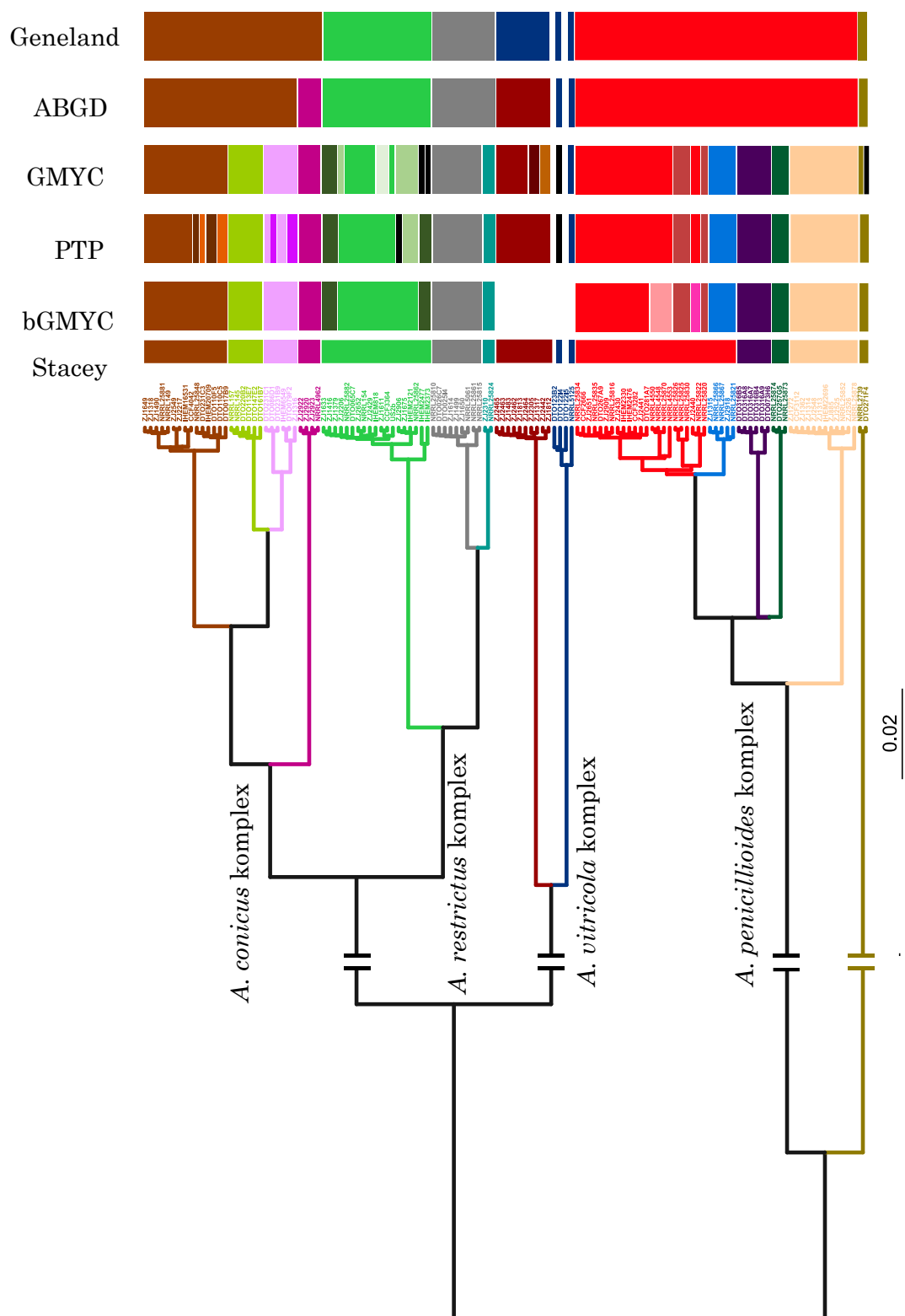
**Komplex *A. restrictus*** byl metodami nejčastěji rozlišován na tři druhy, *A. restrictus* s. str., *A. caesiellus* a jeden nový druh *A. caesiellus* „sp. 2“. Toto rozdělení bylo nejvíce porušováno při použití sekvencí pro  $\beta$ -tubulin, kdy docházelo k rozpadu druhu *A. restrictus* s. str. na více druhů. Nový druh *A. caesiellus* „sp. 2“ nebyl rozlišen většinou metod pouze při použití sekvencí ITS a LSU. Metoda Geneland rozlišovala vždy pouze dva druhy.

**Komplex *A. vitricola*** rozdělila většina metod na tři druhy, *A. vitricola* s. str. a 2 nové druhy, druh *A. vitricola* s. str. byl však zastoupen pouze jedním izolátem, genetická vzdálenost od izolátů jednoho z potenciálních nových druhů nebyla výrazná a multilokusová metoda Stacey rozdělila komplex pouze na dva druhy. Všechny metody mají potíže s rozlišením druhů zastoupených pouze jedním izolátem, proto pokud není jiný jednoznačný důvod pro rozdělení souboru do dvou druhů, je doporučováno zachovat konzervativní přístup a ponechat taxonomické rozhodnutí o existenci nového druhu do doby, kdy bude k dispozici více izolátů (Carstens *et al.* 2013). Metoda Geneland rozlišovala vždy pouze jeden druh.

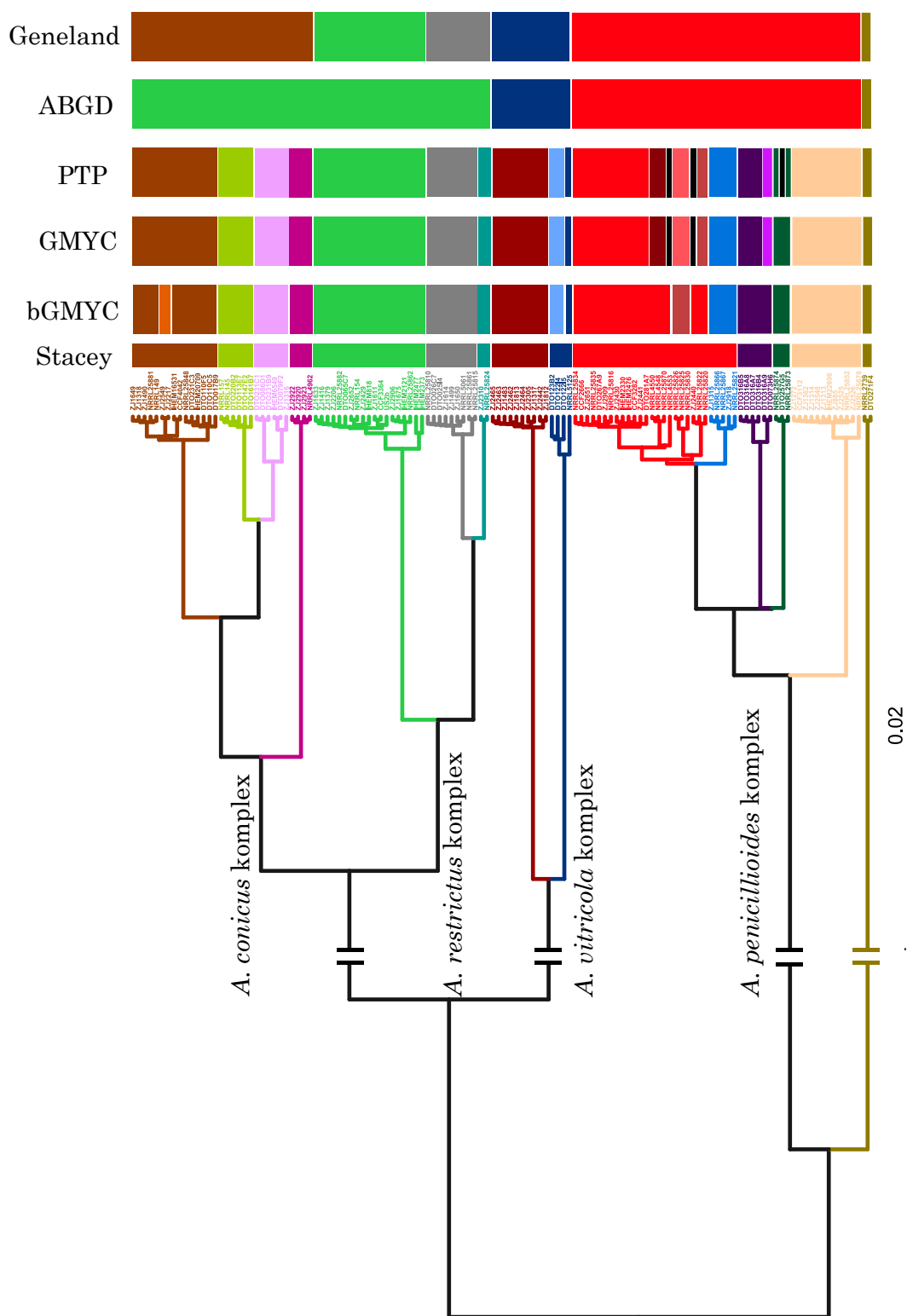
Nejkomplikovanějším se ukázal být **komplex *A. penicilliioides***. Až do současnosti se jedná pouze o jeden popsáný druh. Tento komplex byl nejčastěji rozdělován na šest (tedy pět nových *A. penicilliioides* „sp. 2“, *A. penicilliioides* „sp. 3“, *A. penicilliioides* „sp. 4“, *A. penicilliioides* „sp. 5“ a *A. penicilliioides* „sp. 6“) druhů, v některých případech ale i na mnohem více. Topologie stromu v tomto komplexu se výrazně lišila v závislosti na použitém

lokusu (v příloze?). Pět ze šesti rozlišených druhů se však vždy tvořilo monofyletické skupiny. Genetická vzdálenost potenciálního nového druhu *A. penicilliioides* „sp. 5“ od druhu *A. penicilliioides* s. str. nebyla příliš velká, tento druh také nebyl podpořen multilokusovou metodou Stacey, ale byl jednoznačně odlišen lineární diskriminační analýzou, založenou na mikromorfologických znacích (viz kapitola 3.2). Naopak potenciální nový druh *A. penicilliioides* „sp. 6“, který byl rozlišován většinou jednolokusových metod, nebyl podpořen metodou Stacey a nebyl od druhu *A. penicilliioides* s. str. odlišen ani lineární diskriminační analýzou (viz kapitola 3.2). Navíc izoláty druhu *A. penicilliioides* „sp. 6“ ani netvořili monofyletický clade ve všech jednolokusových stromech. I v rámci tohoto komplexu rozlišila metoda Geneland pouze jeden druh.

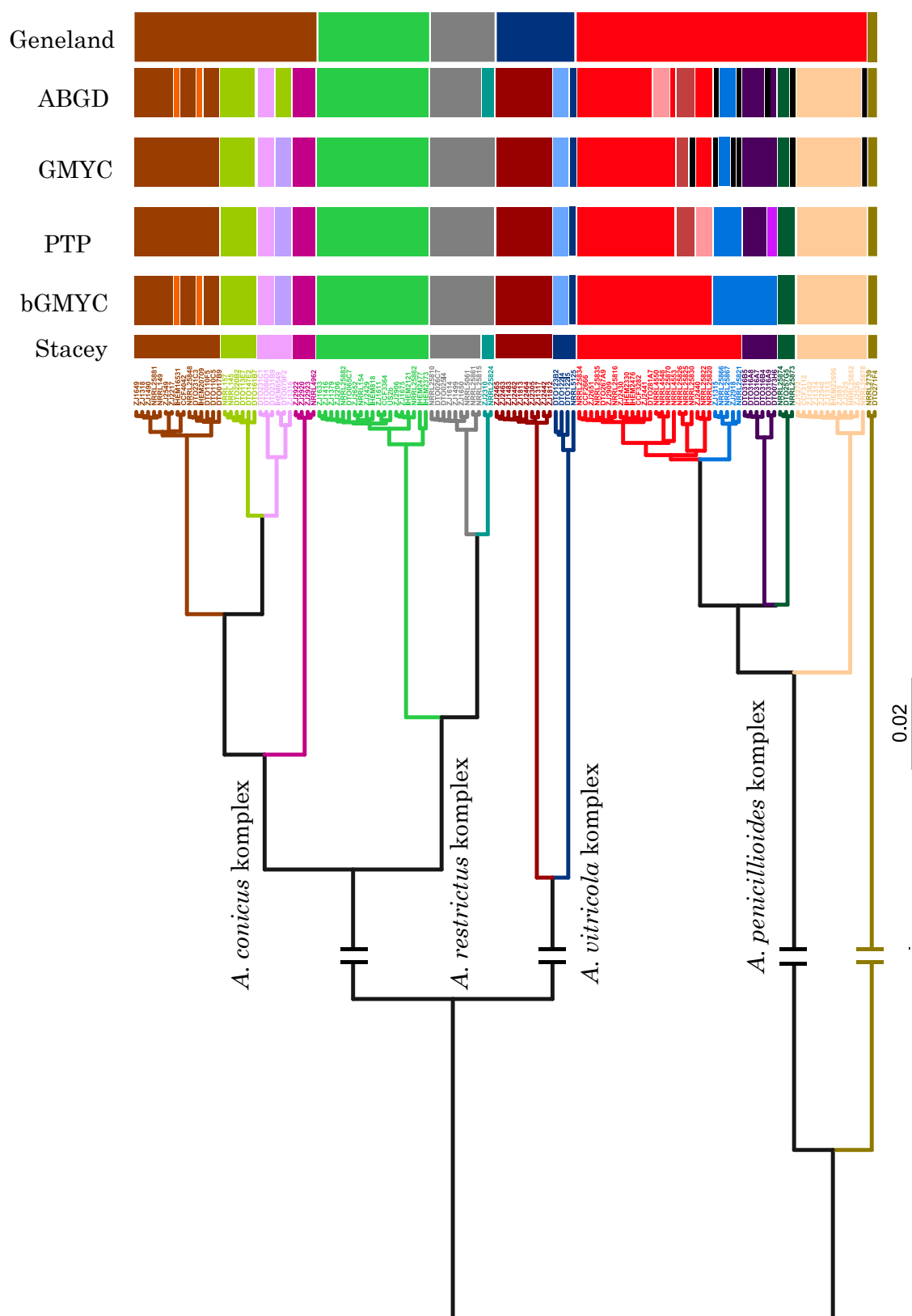
V každé analýze byl rozlišen druh *A. halophilicus*.



**Obrázek 3.** Schematické znázornění výsledků fáze „objevení druhů“ metodou Stacey a jednolokusovými metodami na základě sekvencí pro  $\beta$ -tubulin.

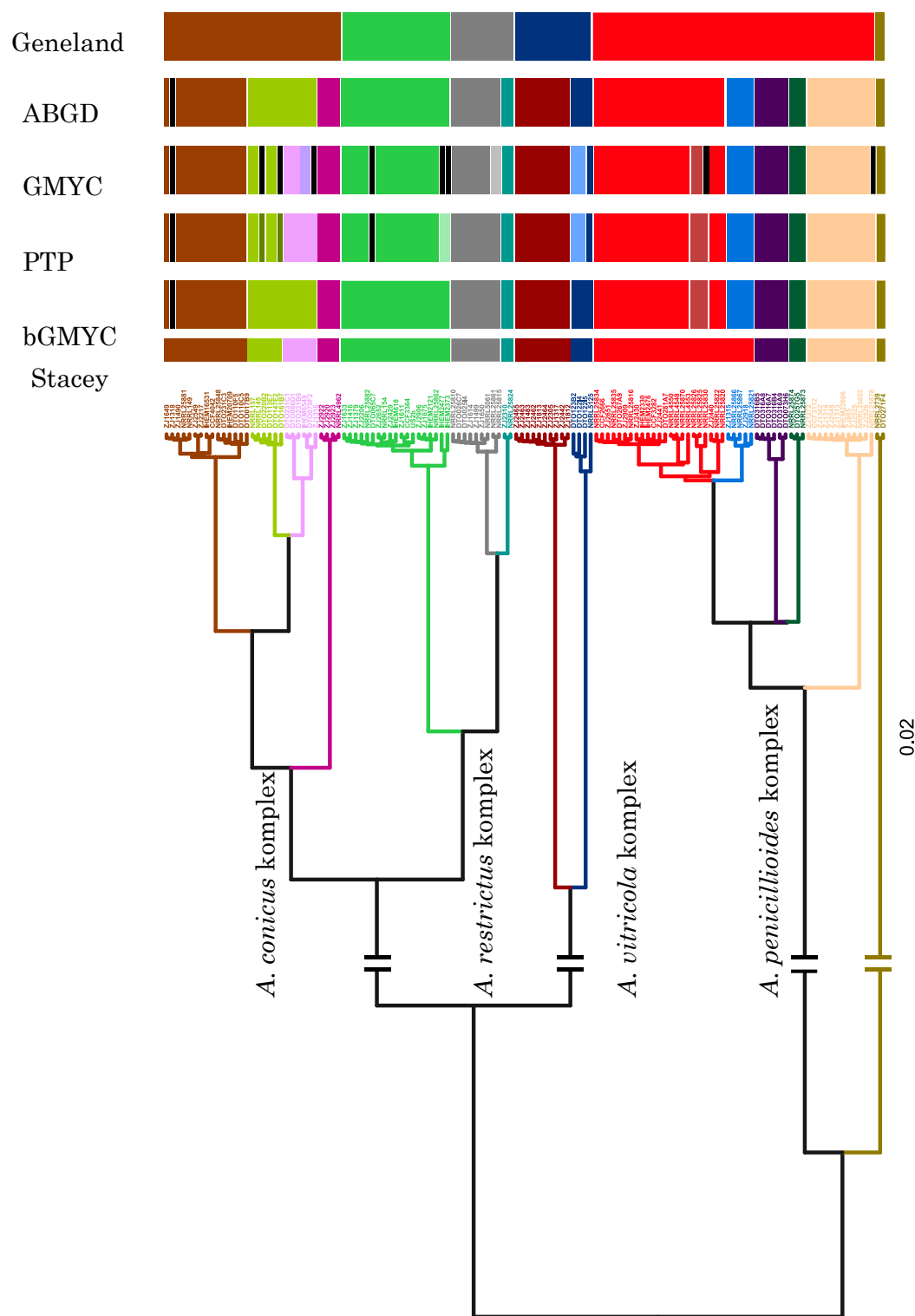


**Obrázek 4.** Schematické znázornění výsledků fáze „objevení druhů“ metodou Stacey a jednolokusovými metodami na základě sekvencí pro **kalmodulin**.

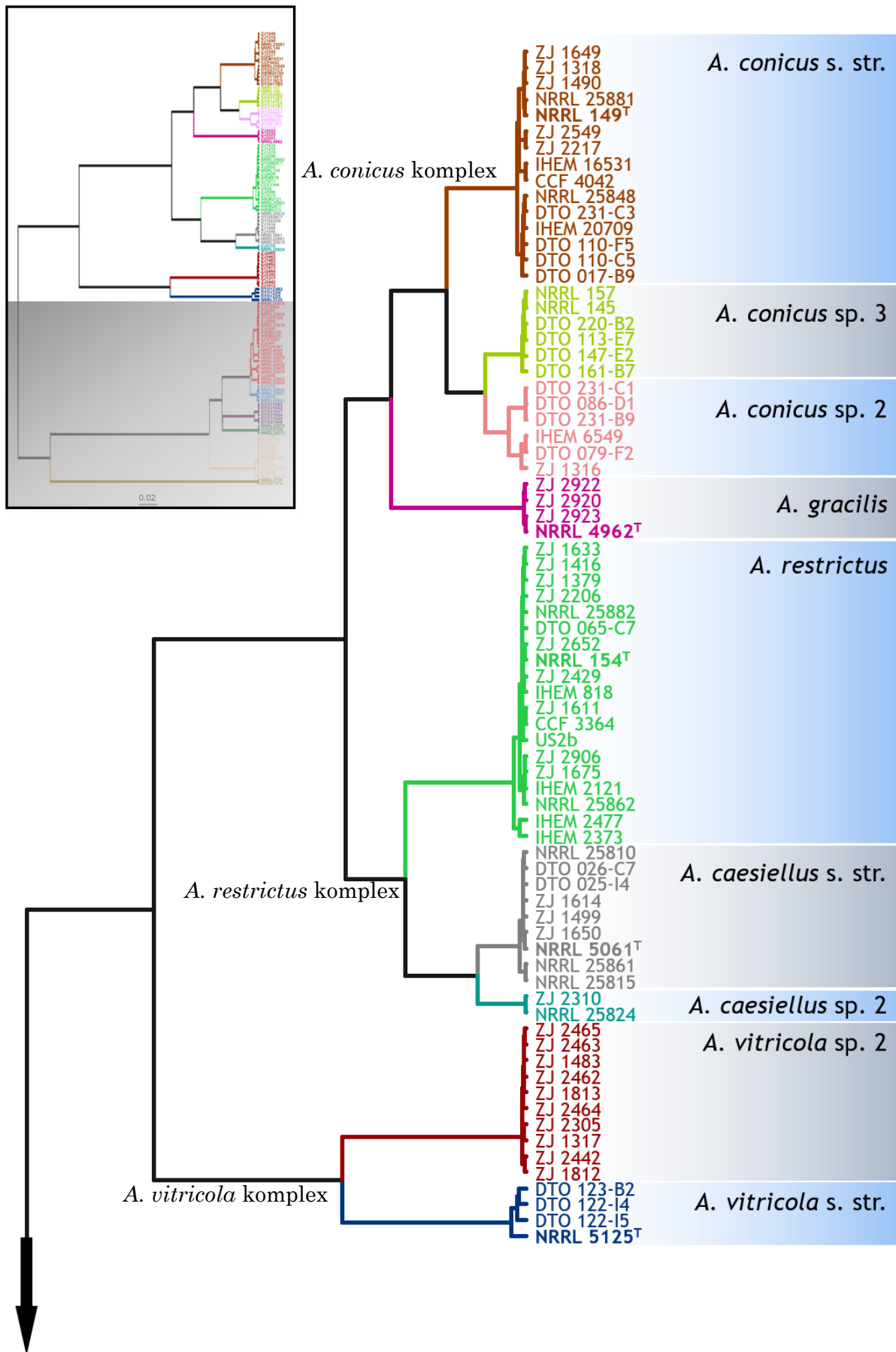


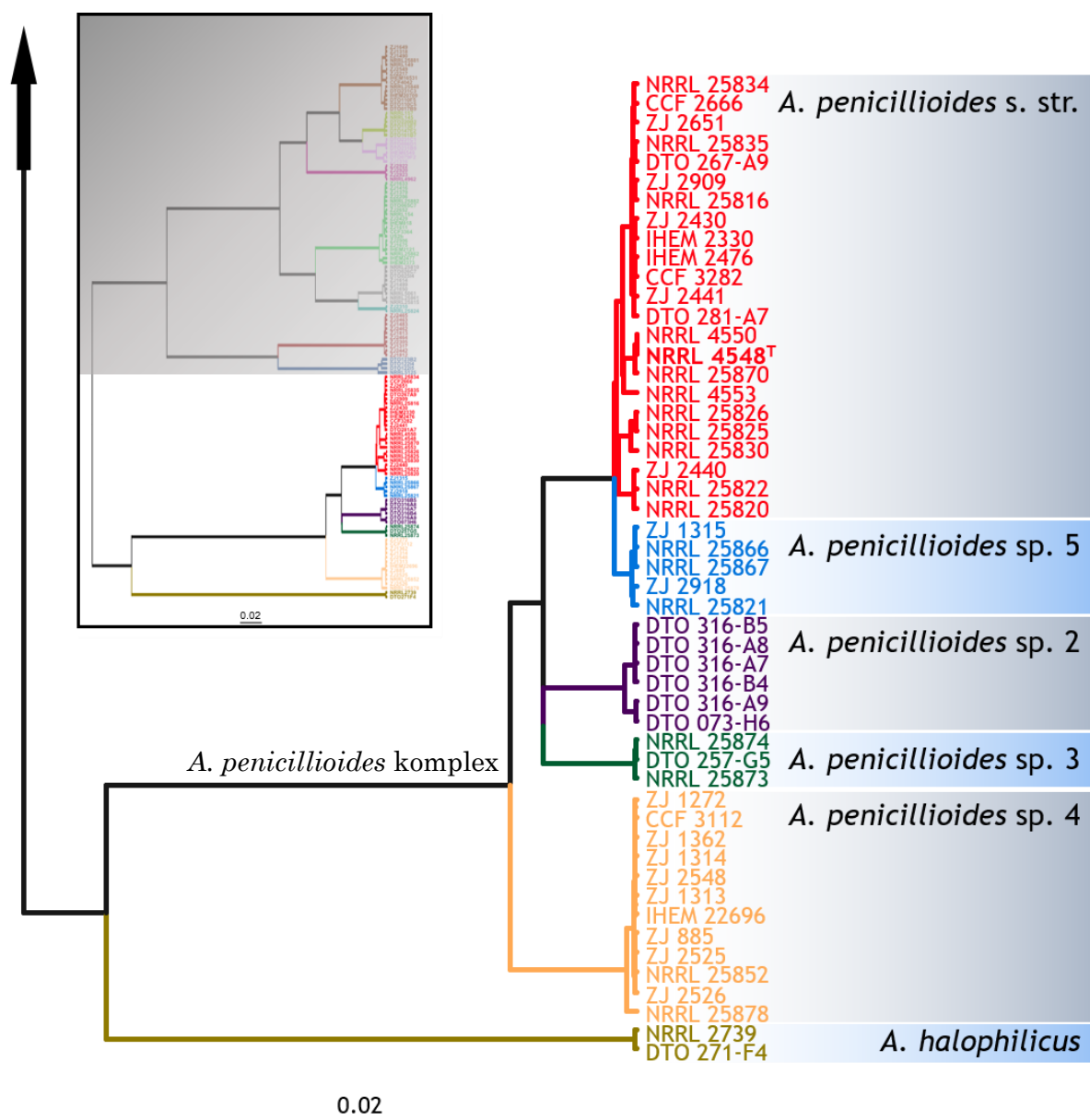
**Obrázek 5.** Schematické znázornění výsledků fáze „objevení druhů“ metodou Stacey a jednolokusovými metodami na základě sekvencí pro ITS a LSU.



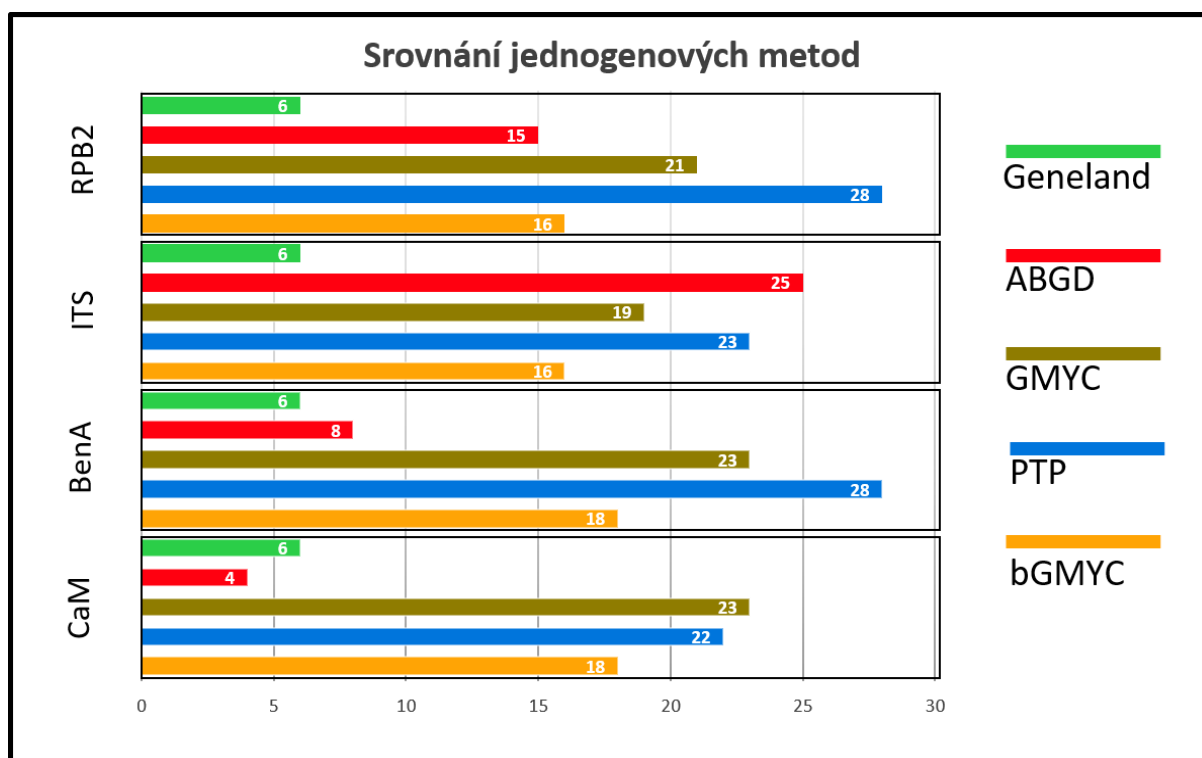


**Obrázek 6.** Schematické znázornění výsledků fáze „objevení druhů“ metodou Stacey a jednolokusovými metodami na základě sekvencí pro **RPB2**.





**Obrázek 7.** Fylogenetický strom vytvořený metodou \*BEAST v programu BEAST 2.3.2 (Bouckaert *et al.* 2014). Strom byl vytvořen na základě sekvencí všech čtyř lokusů ( $\beta$ -tubulin, kalmodulin, ITS a LSU a RPB2) od 126 izolátů. Celková délka alignmentu byla 3163 bazí, z toho 1000 (31,6 %) pozic bylo variabilních a 913 (28,9 %) pozic bylo parsimonně informativních. Ex-typové izoláty jsou označeny písmenem T v horním indexu. Komplex *A. conicus* byl reprezentován 31 izoláty, komplex *A. restrictus* 30 izoláty, komplex *A. vitricola* 14 izoláty a komplex *A. penicilliioides* byl zastoupen 49 izoláty. Dva izoláty druhu *A. halophilicus* tvoří samostatnou linii oddělenou od hlavních komplexů. Barevné rozlišení koncových větví a kódů izolátů odpovídá klasifikaci do 15 druhů navržené v této práci. Měřítko znázorňuje počet substitucí na jednu pozici v alignmentu (substitutions per site).

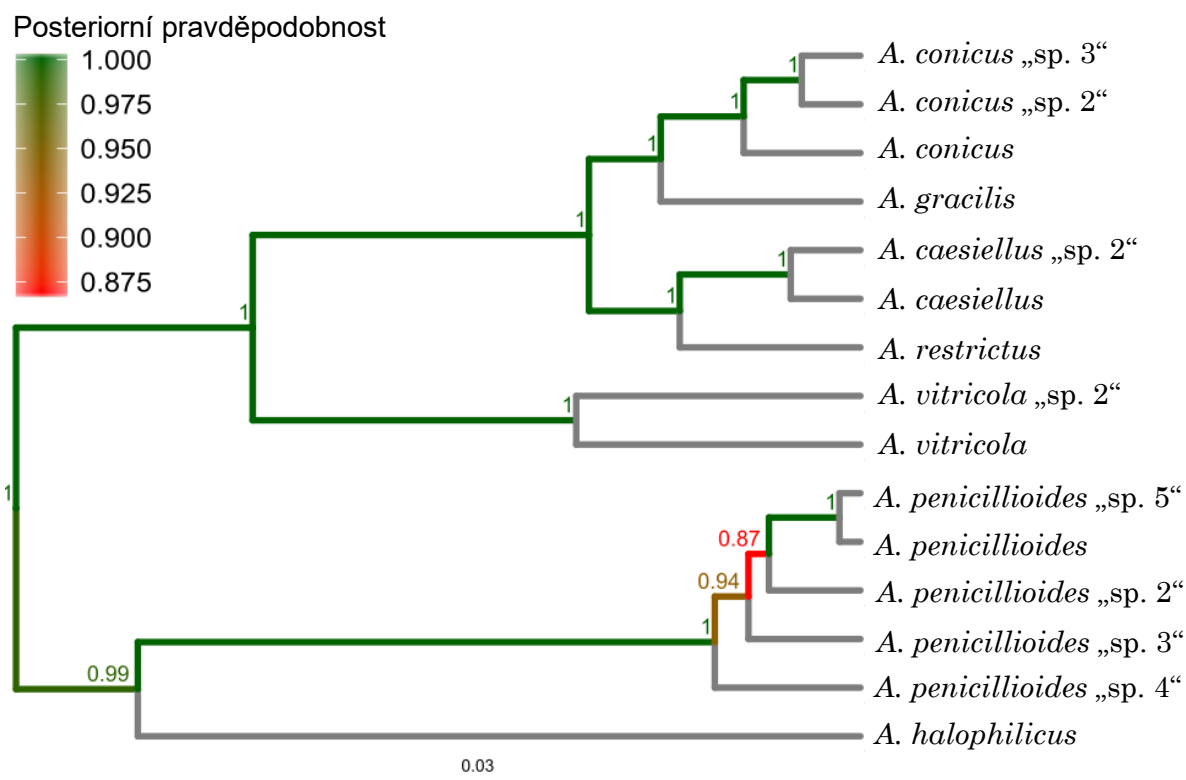


**Obrázek 8.** Srovnání jednolokusových metod. Sloupce vyjadřují počet potenciálních druhů rozlišených danou metodou při použití daného lokusu.

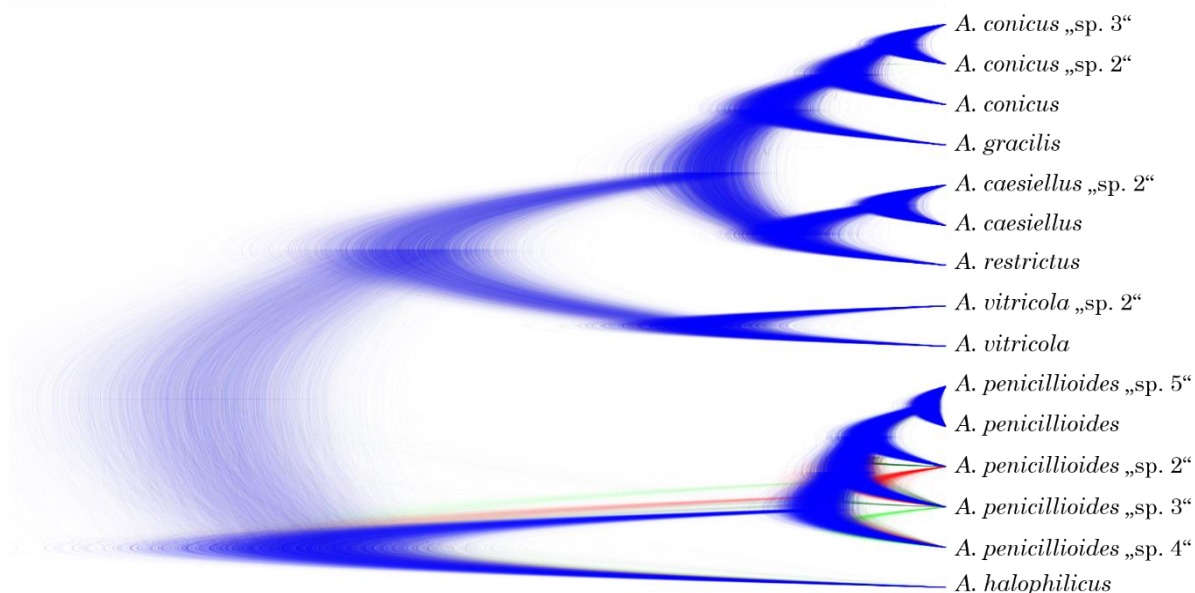
### 3.1.3 Druhový strom (species tree)

Na obrázku 9 je zobrazen výsledek hledání topologie druhového stromu metodou \*BEAST v programu BEAST 2.3.2 (Bouckaert *et al.* 2014). Z tohoto stromu je patrné, že vztahy v rámci komplexu *A. penicilliioides* nejsou zcela vyřešeny. Není jasné, jestli se nejdříve oddělil druh *A. penicilliioides* „sp. 2“ nebo *A. penicilliioides* „sp. 3“. Kromě této nejednoznačné topologie jsou však všechny ostatní nody jednoznačně podpořeny.

Výsledky stejné analýzy, pouze vyjádřené jiným způsobem, vidíme na obrázku 10. Jedná se o zobrazení pomocí programu Densitree (Bouckaert 2010). Tento program znázorňuje podporu větví graficky. V obrázku jsou najednou zobrazeny všechny stromy vytvořené v dané analýze (kromě stromů odstraněných jako burn-in). Stromy, jejichž topologie odpovídá nejčastější topologii v dané analýze, jsou zobrazeny modrou barvou, stromy s druhou nejčastější topologií jsou zobrazeny červeně, stromy s třetí nejčastější topologií světle zeleně a jakékoliv další možné topologie jsou zobrazeny tmavě zeleně. Opět je zřejmé, že jediným místem nejistoty v topologii je rozhraní druhů *A. penicilliioides* „sp. 2“ a *A. penicilliioides* „sp. 3“, kde se vyskytují červené a zelené stromy, tedy odchylky od nejčastější topologie.



**Obrázek 9.** Druhový strom vytvořený metodou \*BEAST v programu BEAST 2.3.2. Strom byl vytvořen na základě sekvencí čtyř genů a koncové větve představují jednotlivé druhy (každá v sobě však zahrnuje všechny izoláty daného druhu).



**Obrázek 10.** Druhový strom pocházející ze stejné analýzy jako strom na obrázku 9, v tomto případě zobrazený programem Densitree (Bouckaert 2010). Stromy s nejčastější topologií jsou zobrazeny modře, stromy s druhou nejčastější topologií červeně a stromy s třetí nejčastější topologií světle zeleně. Jakákoliv jiná topologie je zobrazena tmavě zeleně. Je zřejmé, že naprostá většina větví je jednoznačně podpořena.

### 3.1.4 „Potvrzení druhů“ (species validation)

#### 3.1.4.1 BP&P

Na tomto místě by se měla objevit tabulka s hodnotami podpory pro jednotlivé druhy při různém přiřazení izolátů do druhů a také při různém nastavení hodnot parametrů  $\tau$  (čas mezi speciemi) a  $\theta$  (parametr velikosti populací). Tato tabulka je však nepodstatná. Při použití rozdělení získaného ve fázi objevení druhů (species discovery) byla vždy, bez ohledu na nastavení parametrů  $\tau$  a  $\theta$ , výsledkem analýzy 100% podpora pro všechny druhy. Pokud byly některé druhy rozděleny do více druhů, jak se tomu stalo při použití některých metod ve fázi objevení druhů („oversplitting“ – viz kapitola 3.1.2), výsledkem byla opět 100% podpora pro plně rozlišený strom (tzn. 100% podpora pro všechny potenciální druhy), což bylo v rozporu s očekáváním. Důvody tohoto rozporu a problematika analýzy v programu BP&P jsou dále rozebrány v diskuzi.

#### 3.1.4.2 GSI

Výsledky analýzy metodou GSI (genealogical sorting index) (Bazin et al. 2008, Cummings *et al.* 2008) jsou zobrazeny v tabulce 5. Tato analýza nepřinesla 100% podporu pro všechny linie, což je logické, protože pracuje s topologiemi všech jednolokusových stromů, které se od sebe lišily, výsledky permutačních testů však ukázaly velice nízké p-hodnoty pro všechny druhy, což znamená, že všechny druhy jsou na základě GSI jednoznačně exkluzivní vývojové linie.

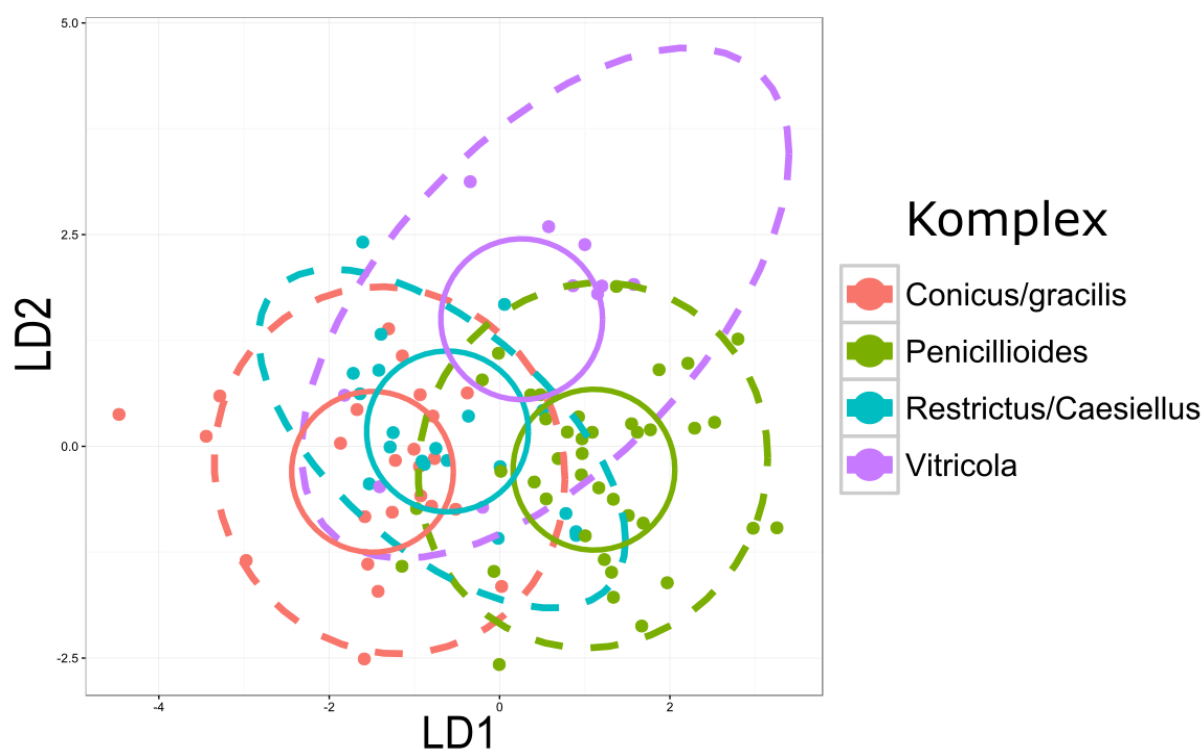
**Tabulka 5.** Výsledky analýzy metodou GSI. Hodnota  $gsi_T$  je váženým průměrem hodnot  $gsi$  daného druhu ve všech jednolokusových stromech. P-hodnota je výsledkem permutační analýzy, při které nulová hypotéza předpokládá, že skupiny izolátů označené jako potenciální druhy nejsou ve skutečnosti samostatné vývojové linie.

druh	$gsi_T$	p-hodnota
<i>A. restrictus</i>	1	0,0001
<i>A. caesiellus</i>	0,941	0,0001
<i>A. caesiellus</i> „sp. 2“	1	0,0004
<i>A. conicus</i>	0,950	0,0001
<i>A. conicus</i> „sp. 2“	0,805	0,0001
<i>A. conicus</i> „sp. 3“	0,902	0,0001
<i>A. gracilis</i>	1	0,0001
<i>A. vitricola</i>	1	0,0006
<i>A. vitricola</i> „sp. 2“	1	0,0001
<i>A. penicilliioides</i>	0,875	0,0001
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 2“	0,884	0,0001

<i>A. penicilliioides</i> „sp. 3“	1	0,0001
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 4“	1	0,0001
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 5“	0,780	0,0001
<i>A. halophilicus</i>	1	0,0003

## 3.2 Mikromorfologie

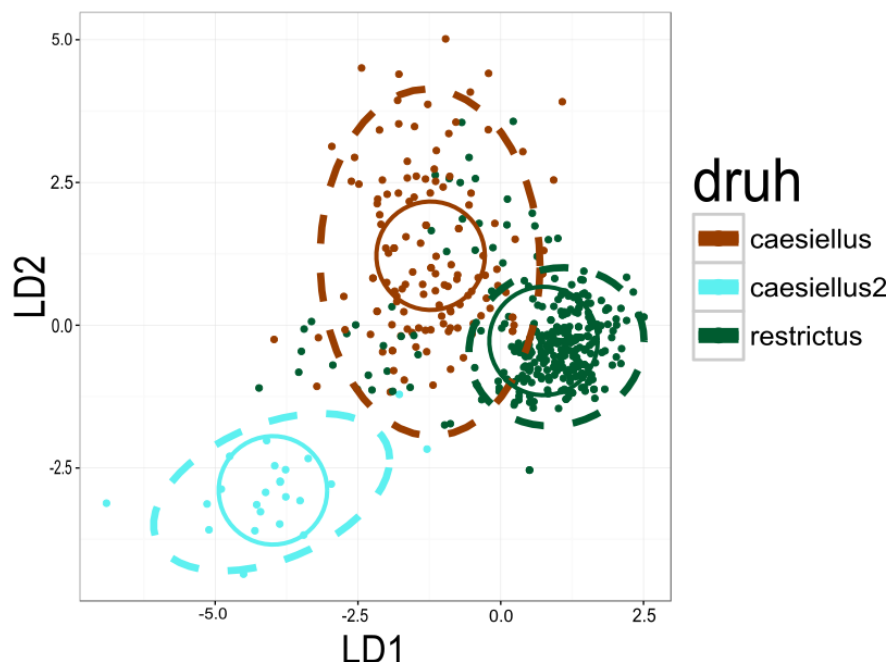
Obrázek 11 zobrazuje výsledek Lineární diskriminační analýzy, ve které byly jako skupiny nastaveny celé druhové komplexy a k analýze byly použity jen průměrné hodnoty znaků pro jednotlivé druhy. Z diagramu je zřejmé, že především komplex *A. restrictus* není možné jednoznačně odlišit od žádného ze zbylých tří komplexů. Tento komplex se však ode všech ostatních výrazně liší svou schopností osmotolerance, tedy rychlostí růstu na médiích s různou vodní aktivitou (viz kapitola 3.3). Ostatní 3 komplexy oddělila diskriminační analýza výrazněji. V rámci komplexu *A. vitricola* dochází k velkému rozptýlu, který je způsoben velkým rozdílem mezi dvěma druhy tvořícími tento komplex.



**Obrázek 11.** Lineární diskriminační analýza s rozdělením izolátů do druhových komplexů. Elipsy tvořené přerušovanými čarami představují 95% konfidenční interval, kruhy tvořené plnými čarami znázorňují euklidovskou vzdálenost od středu. Analýza byla provedena v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

Na obrázcích 12-16 se nacházejí ordinační diagramy zobrazující výsledky lineární diskriminační analýzy (LDA) v rámci jednotlivých druhových komplexů.

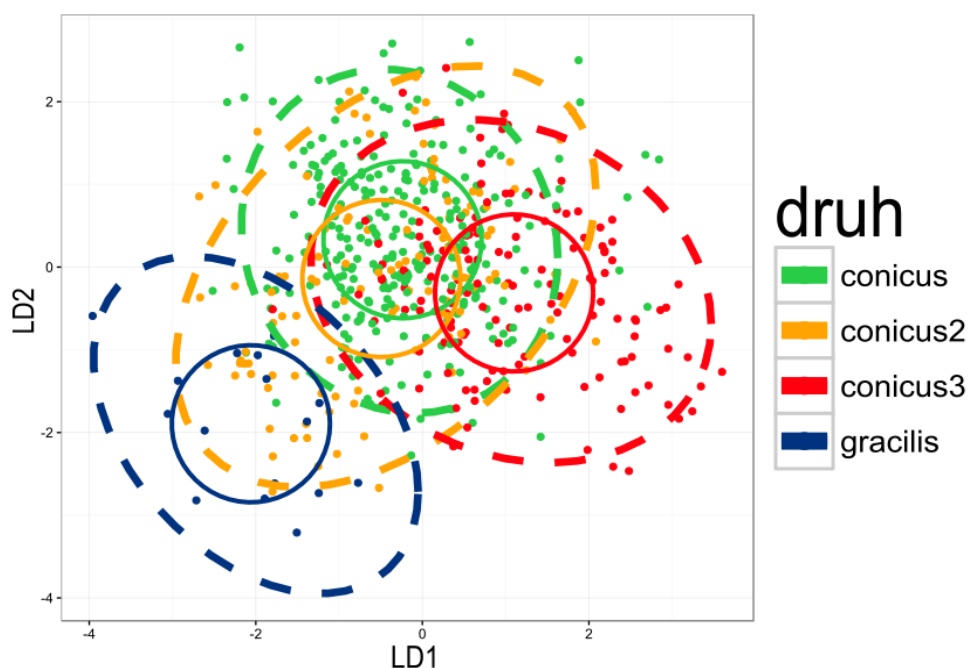
Na obrázku 12 (*A. restrictus* komplex) vidíme, druh *A. caesiellus* „sp. 2“ je jednoznačně oddělen od zbylých dvou druhů, což je způsobeno zejména výrazně větším měchýřkem konidioforu u izolátů druhu *A. caesiellus* „sp. 2“ než u ostatních druhů. Některé kmeny zbývajících dvou druhů se překrývají, určitý rozdíl mezi oběma druhy je však i zde patrný.



**Obrázek 12.** Výsledek lineární diskriminační analýzy provedené v programu R 3.2.3 na základě mikromorfologických dat druhů z komplexu *A. restrictus*. Elipsy tvořené přerušovanými čarami představují 95% konfidenční interval, kruhy tvořené plnými čarami znázorňují euklidovskou vzdálenost od středu. Analýza byla provedena v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

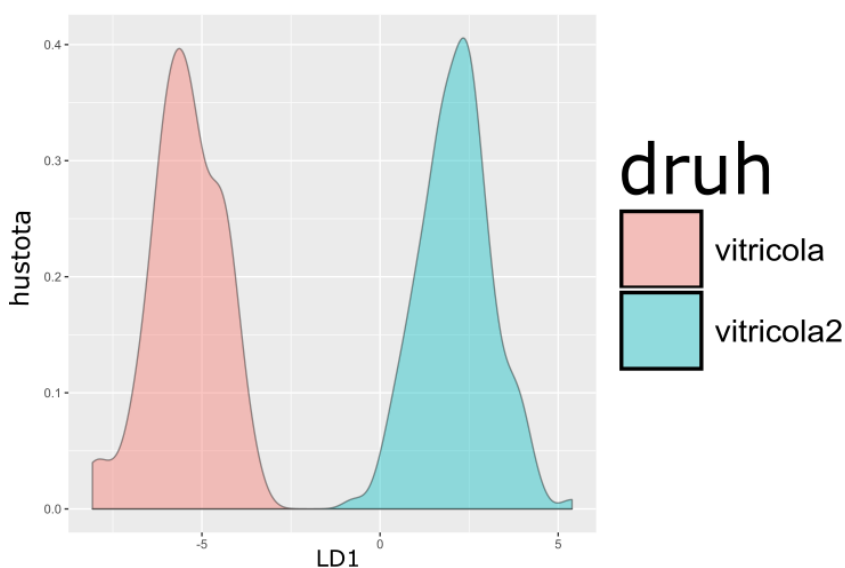
Výsledky analýzy komplexu *A. conicus* (obrázek 13) naznačují, že mikromorfologickými daty je možné odlišit druh *A. gracilis*. Mezi druhy *A. conicus*, *A. conicus* „sp. 2“ a *A. conicus* „sp. 3“ nejsou výrazné rozdíly. *A. gracilis* se od ostatních druhů liší zejména kratšími konidiemi.





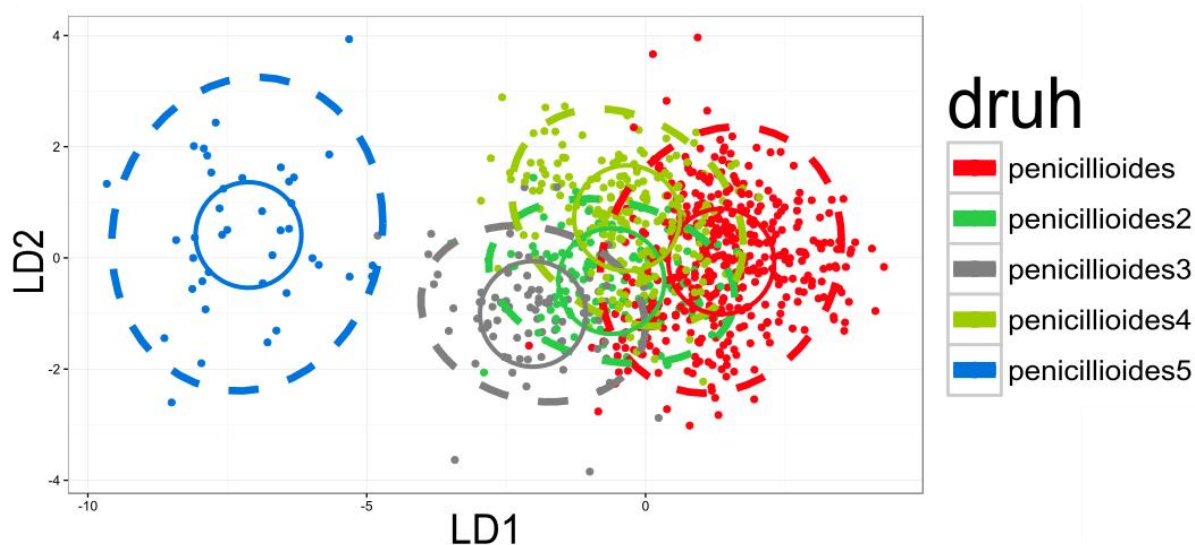
**Obrázek 13.** Výsledek lineární diskriminační analýzy provedené v programu R 3.2.3 na základě mikromorfologických dat druhů z komplexu *A. conicus*. Elipsy tvořené přerušovanými čarami představují 95% konfidenční interval, kruhy tvořené plnými čarami znázorňují euklidovskou vzdálenost od středu. Analýza byla provedena v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

Komplex *A. vitricola* (obrázek 14) zahrnuje pouze dva druhy, z tohoto důvodu je na ordinačním diagramu znázorněna pouze jedna osa. Tyto dva druhy lze velmi dobře rozlišit podle mikromorfologických znaků. Izoláty druhu *A. vitricola* „sp. 2“ mají kratší a užší konidie, ale širší stopky i měchýřky konidioforů.



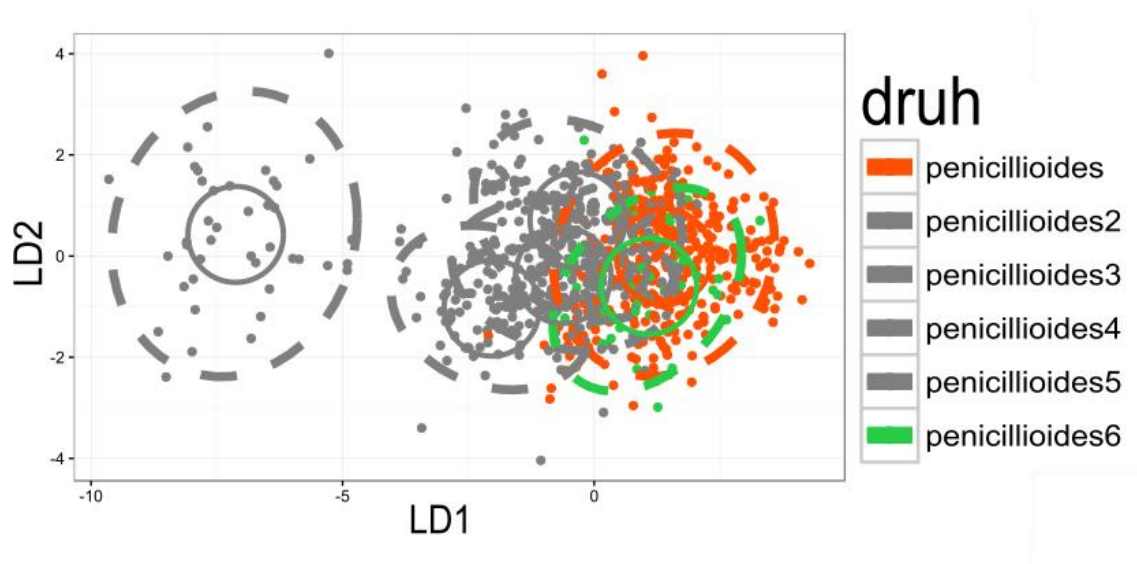
**Obrázek 14.** Výsledek lineární diskriminační analýzy provedené v programu R 3.2.3 na základě mikromorfologických dat druhů z komplexu *A. vitricola*. Elipsy tvořené přerušovanými čarami představují 95% konfidenční interval, kruhy tvořené plnými čarami znázorňují euklidovskou vzdálenost od středu. Analýza byla provedena v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

V rámci komplexu *A. penicilliioides* (obrázek 15) lze mikromorfologickými znaky nejsnáze odlišit druh *A. penicilliioides* „sp. 5“. Tento druh se od ostatních odlišuje především výrazně širšími stopkami i měchýřky konidioforů. Tento fakt přispěl k rozhodnutí, že se jedná o samostatný druh, i když nebyl podpořen všemi molekulárně-genetickými analýzami (viz výše).



**Obrázek 15.** Výsledek lineární diskriminační analýzy provedené v programu R 3.2.3 na základě mikromorfologických dat druhů z komplexu *A. penicilliioides*. Elipsy tvořené přerušovanými čarami představují 95% konfidenční interval, kruhy tvořené plnými čarami znázorňují euklidovskou vzdálenost od středu. Analýza byla provedena v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

K opačnému výsledku vedlo označení izolátů, které byly také v některých jednolokusových analýzách považovány za samostatný druh (viz kapitola 3.1.2) jako *A. penicilliioides* „sp. 6“. Výsledek je zobrazen na obrázku 16 a je zřejmé, že tento potenciální druh nemá žádnou podporu v mikromorfologických datech.

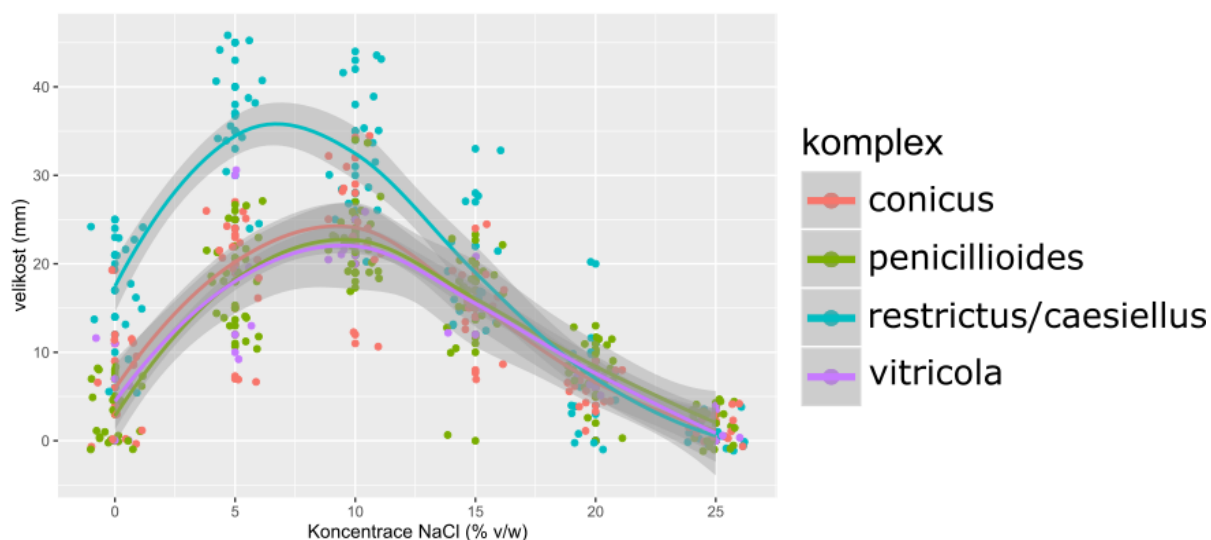


**Obrázek 16.** Výsledek lineární diskriminační analýzy provedené v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015) na základě mikromorfologických dat druhů z komplexu *A. penicillioides*. Elipsy tvořené přerušovanými čarami představují 95% konfidenční interval, kruhy tvořené plnými čarami znázorňují euklidovskou vzdálenost od středu. Analýza byla provedena v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

s důrazem na porovnání potenciálního nového druhu *A. penicillioides* „sp. 6“ a druhu *A. penicillioides* s. str. Ostatní druhy jsou zobrazeny šedou barvou.

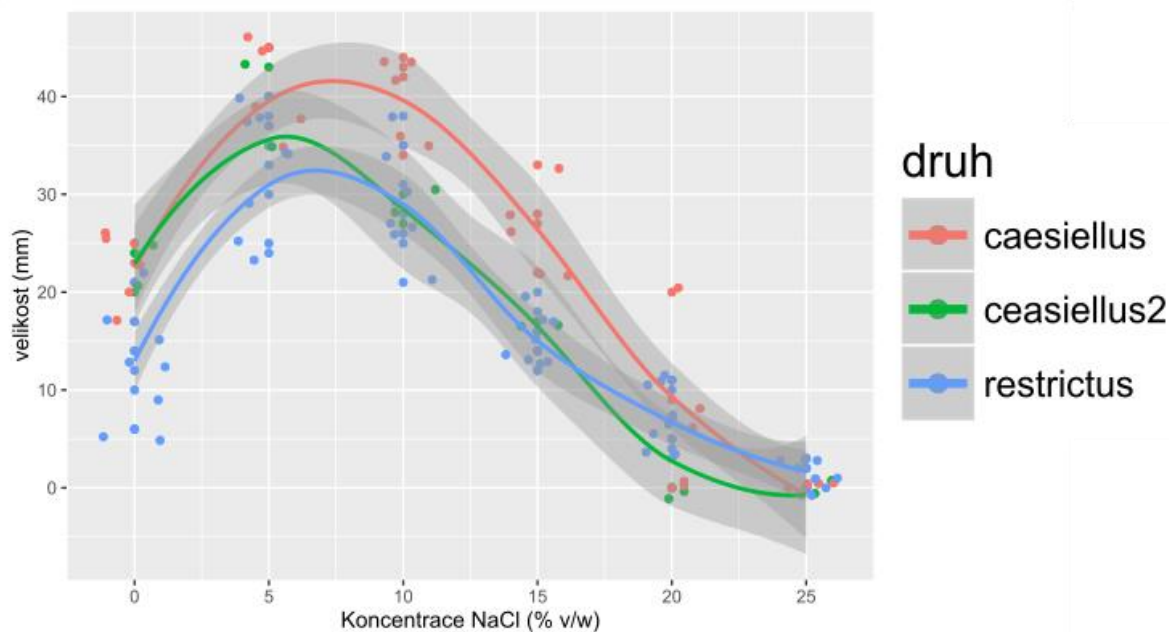
### 3.3 Růst v osmotickém gradientu

Hodnocení dat získaných měření růstu v osmotickém gradientu bylo provedeno podobným způsobem jako v případě mikromorfologických dat. Nejprve byly porovnány druhové komplexy. Na obrázku 17 vidíme výsledek tohoto srovnání. Všechny komplexy vykazovaly vysokou vnitřní variabilitu. Pouze komplex *A. restrictus* bylo možné jednoznačně odlišit od zbylých komplexů, na rozdíl od mikromorfologických dat, kde právě komplex *A. restrictus* nebylo možné jednoznačně odlišit od žádného dalšího komplexu (viz obrázek 11). Důvodem je, že druhy komplexu *A. restrictus* dokáží růst výrazně rychleji při nízkých koncentracích soli v porovnání s ostatními komplexy.



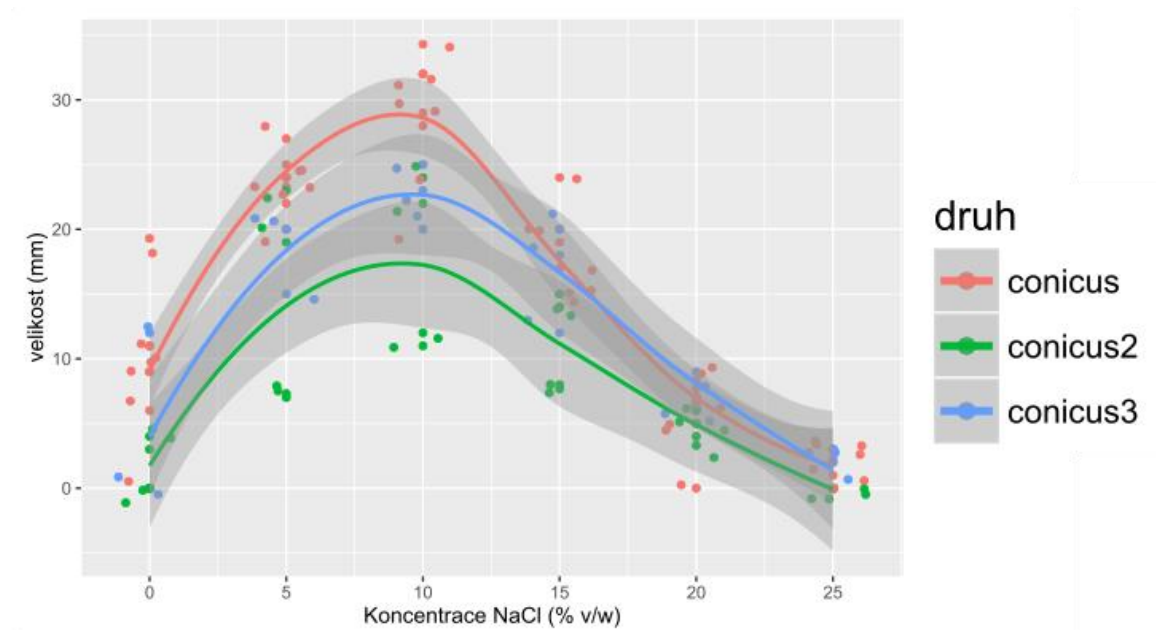
**Obrázek 17.** Křivky růstu v osmotickém gradientu všech testovaných kmenů. Barevné rozdělení kmenů odpovídá příslušnosti do druhových komplexů. Křivky byly vytvořeny metodou lokální regrese (LOESS) v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

Obrázek 18 znázorňuje růstové křivky v komplexu *A. restrictus*. Druhy *A. caesiellus* a *A. caesiellus* „sp. 2“ rostou rychleji než *A. restrictus* s. str. při nulové koncentraci soli (tzn. běžné médium MEA), médiu MEA + 10% NaCl a MEA + 15% NaCl roste nejrychleji druh *A. caesiellus*.



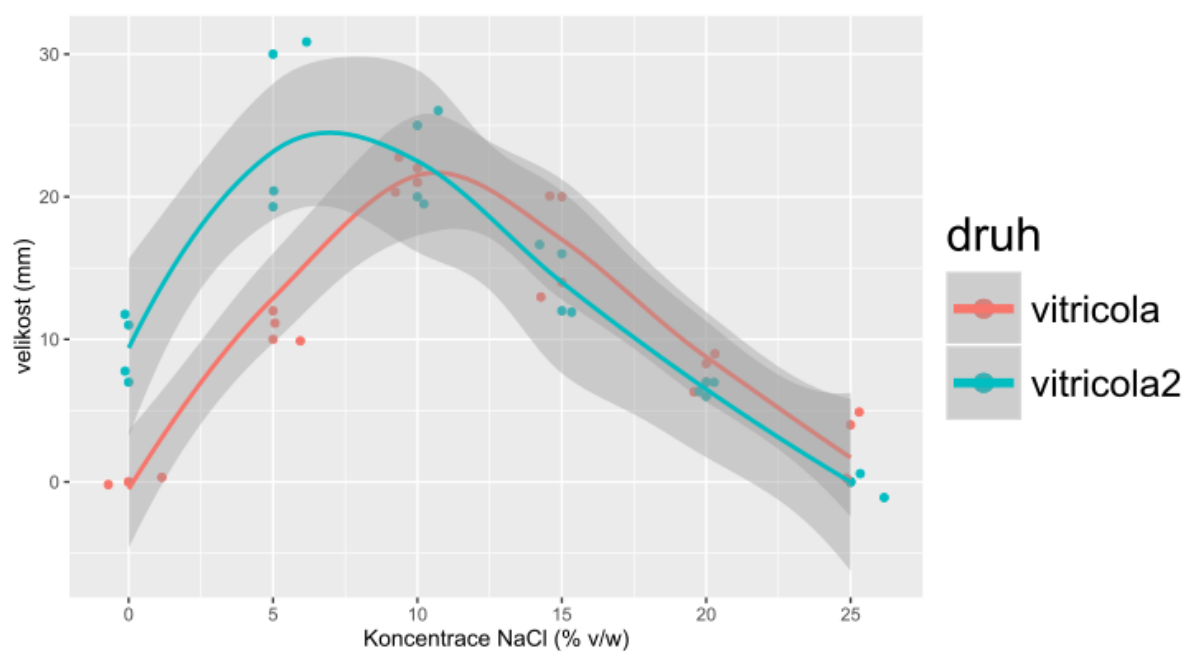
**Obrázek 18.** Křivky růstu v osmotickém gradientu druhů patřících do komplexu *A. restrictus*. Křivky byly vytvořeny metodou lokální regrese (LOESS) v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

Jednotlivé druhy komplexu *A. conicus* (obrázek 19) je možné částečně odlišit podle rychlosti růstu při 10% koncentraci soli. Druh *A. conicus* roste nejrychleji, *A. conicus* „sp. 2“ pomaleji a druh *A. conicus* „sp. 3“ nejpomaleji. Druh *A. conicus* „sp. 2“ také na rozdíl od zbylých dvou druhů roste velmi pomalu nebo neroste vůbec na médiu s nulovou koncentrací soli. Data o rychlosti růstu v osmotickém gradientu se bohužel nepodařilo získat pro žádný kmen druhu *A. gracilis*, protože tyto kmeny byly k dispozici až po provedení tohoto experimentu.



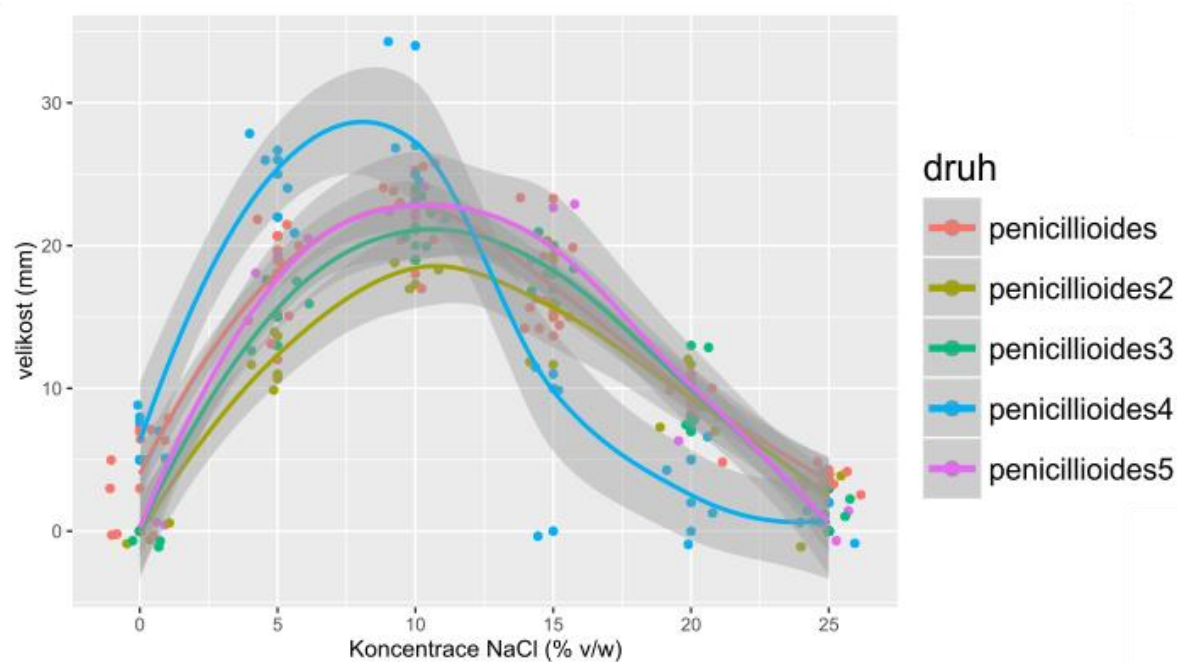
**Obrázek 19.** Křivky růstu v osmotickém gradientu druhů patřících do komplexu *A. conicus*. Křivky byly vytvořeny metodou lokální regrese (LOESS) v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

Druhy komplexu *A. vitricola* (obrázek 20) se liší svou schopností růst při vysoké vodní aktivitě. Druh *A. vitricola* roste pomaleji při 5% koncentraci soli a při nulové koncentraci neroste vůbec na rozdíl od druhu *A. vitricola* „sp. 2“.



**Obrázek 20.** Křivky růstu v osmotickém gradientu druhů patřících do komplexu *A. vitricola*. Křivky byly vytvořeny metodou lokální regrese (LOESS) v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

Na obrázku 21 jsou zobrazeny růstové křivky druhů komplexu *A. penicilliioides*. Od všech ostatních se jednoznačně liší druh *A. penicilliioides* „sp. 4“, který roste rychleji než ostatní druhy při nízkých koncentracích a pomaleji nebo vůbec při vyšších koncentracích soli.



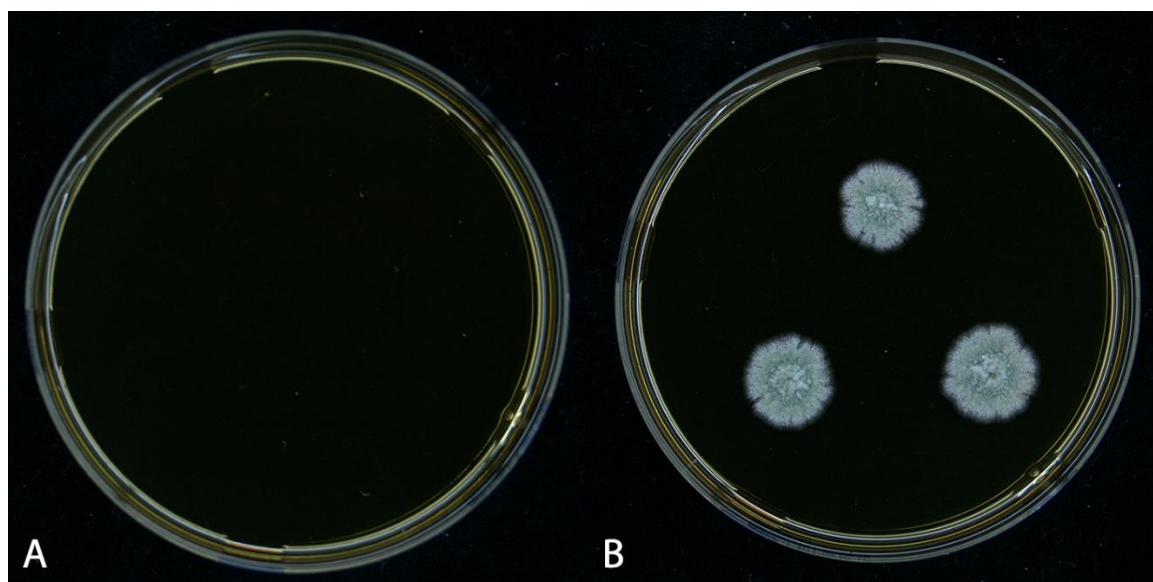


**Obrázek 21.** Křivky růstu v osmotickém gradientu druhů patřících do komplexu *A. penicilliioides*. Křivky byly vytvořeny metodou lokální regrese (LOESS) v programu R 3.2.3 (R Core Team 2015).

### 3.4 Další způsoby rozlišení druhů

Některé druhy nebylo možné odlišit ani pomocí analýzy mikromorfologie, ani růstovými křivkami v osmotickém gradientu. Zejména druhy *A. conicus*, *A. conicus* „sp. 2“ a *A. conicus* „sp. 3“ se výrazně nelišily ani v jedné analýze. Rozdíly je možné nalézt při zkoumání makromorfologie na různých médiích, nebo při pozorování ve skenovacím elektronovém mikroskopu. Izoláty druhu *A. conicus* „sp. 3“ se od zbylých dvou druhů liší ornamentikou spor (viz příloha obr. P6) a odlišnou barvou reverzu na médiu M40Y (barva izolátů druhu *A. conicus* „sp. 3“ je světle žlutozelená (light yellow green) a uprostřed temně oranžová (deep orange), zatímco izoláty zbylých dvou druhů jsou světle žlutozelené (light yellow green) a uprostřed středně olivově zelená (moderate olive green)). *A. conicus* „sp. 2“ se zase liší od ostatních druhů tím, že roste pomaleji nebo neroste vůbec na médiích CYA a MEA s vysokou vodní aktivitou (viz příloha obr. P5).

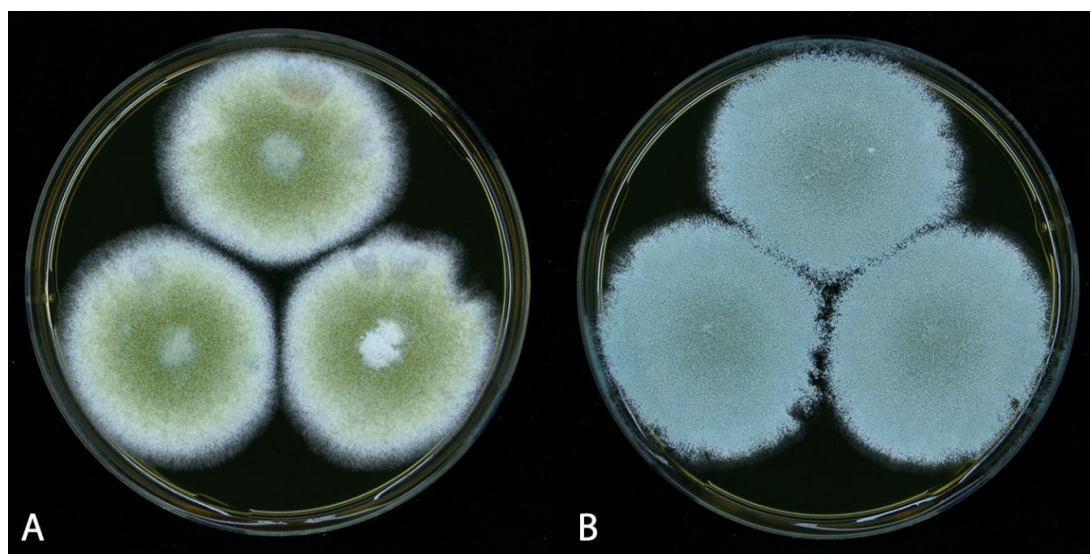
Také mezi druhy *A. penicilliioides*, *A. penicilliioides* „sp. 2“ a *A. penicilliioides* „sp. 3“ nebyly nalezeny výraznější rozdíly. Izoláty druhu *A. penicilliioides* s. str. dokáží na rozdíl od ostatních dvou druhů růst na médiích CYA a MEA (viz příloha obr. P10). Izoláty druhu *A. penicilliioides* „sp. 3“ se od izolátů druhu *A. penicilliioides* „sp. 2“ zase liší schopností růst na médiu M60Y i při teplotě 37 °C (viz obr. 22).



**Obrázek 22.** Porovnání růstu po 14 dnech na médiu M60Y při teplotě 37 °C. A – DTO 073-H6 (*A. penicilliioides* „sp. 2“), B – DTO 316-B3 (*A. penicilliioides* „sp. 3“).

### 3.5 Vnitrodruhová fenotypová variabilita

Kromě vnitrodruhové variability spočívající v drobných odlišnostech v morfologii nebo rychlosti růstu na některých médiích se zdá, že v rámci některých druhů se stabilně vyskytují minimálně 2 odlišné fenotypy. Příkladem takového druhu je *A. vitricola* „sp. 2“. Na obrázku 23 jsou zobrazeny oba fenotypy, vyskytující se u několika izolátů. Fenotyp těchto izolátů nekoreluje s genotypem, lokalitou, ani se substrátem, ze kterého byly izoláty získány. Podobná variabilita není ale u některých skupin vláknitých hub nijak neobvyklá (Rinyu *et al.* 1995, Wang *et al.* 2012).



**Obrázek 23.** Dva fenotypy vyskytující se v rámci druhu *A. vitricola* „sp. 2“. A – ZJ 2462, B – ZJ 1483. Oba izoláty byly kultivovány 14 dní na médiu M40Y při teplotě 25 °C.

### 3.6 Shrnutí analýzy

Kombinací moderních metod pro delimitaci druhů s klasickými taxonomickými metodami bylo v této práci rozlišeno 15 druhů, z nichž osm dosud nebylo popsáno. Toto číslo téměř jistě není konečné a počet druhů v této sekci se v budoucnu ještě zvýší (např. několik dalších nepopsaných druhů nebylo do této práce zařazeno kvůli jejich objevení ve stádiu finalizace práce). Přehled důležitých taxonomických znaků (morfologických i fyziologických) je uveden v tabulkách 6-9. Tabulka 6 se věnuje znakům přítomným na konidiích, tabulka 7 znakům na konidioforech, tabulka 8 morfologii kolonií a v tabulce 9 jsou shrnuty schopnosti růstu jednotlivých druhů na různých médiích.



druh	délka (µm)	šířka (µm)	ornamentace konidií (SEM)	tvar konidií
<i>A. restrictus</i>	3,5–4,5 (4,1±0,4)	2,5–3 (2,9±0,4)	bradavčité (echinulátní)	mladé cylindrické, zralé elipsoidní až soudkovité
<i>A. caesiellus</i>	4,5–6 (5±0,8)	3–4,5 (3,6±0,5)	bradavčité (echinulátní)	mladé cylindrické, zralé elipsoidní
<i>A. caesiellus</i> „sp. 2“	4–5 (4,4±0,2)	2,5–3,5 (3±0,2)	bradavčité (echinulátní)	mladé cylindrické, zralé elipsoidní až vejčité
<i>A. conicus</i>	4–4,5 (4,1±0,4)	2,5–3 (2,9±0,3)	v mládí s jemně hrubou stěnou, zvrásněné, ve zralosti ostnité	mladé velmi dlouhé cylindrické, zralé soudkovité
<i>A. conicus</i> „sp. 2“	3,5–4,5 (4,2±0,5)	2,5–3,5 (2,8±0,3)	v mládí s jemně hrubou stěnou, zvrásněné, ve zralosti ostnité	mladé velmi dlouhé cylindrické, zralé subglobózní
<i>A. conicus</i> „sp. 3“	3,5–5,5 (4,3±0,6)	2,5–3,5 (3,1±0,4)	v mládí s jemně hrubou stěnou, ve zralosti tuberkulátní	mladé velmi dlouhé cylindrické, zralé subglobózní až elipsoidní
<i>A. gracilis</i>	3–4 (3,4±0,2)	2–3 (2,5±0,2)	s ostrými trny (aculeate)*	subglobózní, soudkovité
<i>A. vitricola</i>	4,5–5,5 (4,8±0,4)	3–4 (3,4±0,3)	v mládí s jemně hrubou stěnou, ve zralosti s dlouhými ostny	subglobózní
<i>A. vitricola</i> „sp. 2“	3,5–4,5 (4,1±0,2)	2–3 (2,9±0,2)	ostnité	subglobózní
<i>A. penicillioides</i>	3,5–4 (4±0,6)	2,5–3,5 (3±0,5)	tuberkulátní	mladé cylindrické až elipsoidní, zralé subglobózní, soudkovité
<i>A. penicillioides</i> „sp. 2“	3,5–4,5 (4±0,4)	2,5–3,5 (2,9±0,3)	tuberkulátní	mladé cylindrické až elipsoidní, zralé subglobózní, soudkovité
<i>A. penicillioides</i> „sp. 3“	4–5 (4,8±0,2)	3–4 (3,5±0,2)	velmi hrubé	mladé cylindrické až elipsoidní, zralé subglobózní, soudkovité
<i>A. penicillioides</i> „sp. 4“	3,5–4,5 (3,9±0,3)	2,5–3,5 (3±0,3)	tuberkulátní	mladé elipsoidní, zralé globózní, soudkovité
<i>A. penicillioides</i> „sp. 5“	4,5–5,5 (5,2±0,3)	3,5–4,5 (3,9±0,3)	tuberkulátní	mladé elipsoidní, zralé subglobózní, soudkovité

**Tabulka 6.** Charakteristika konidií u druhů *Aspergillus* sekce *Restricti*.

\* Podle Kozakiewicz (1989).

druh	šířka stopky (μm)	šířka měchýřku (μm)	délka fialid (μm)	povrch stopky (SEM)	tvar měchýřku
<i>A. restrictus</i>	4–5,5 (4,8±1)	9–12 (11,5±2)	8–9 (8,4±0,9)	hustě ochlupený	hruškovitý až klavátní
<i>A. caesiellus</i>	5–7,7 (5,5±0,8)	11–16 (13,2±2)	8–9 (8,2±2)	hustě ochlupený	hruškovitý, subklavátní až klavátní
<i>A. caesiellus</i> „sp. 2“	7–8 (7,3±0,7)	16–20 (18,6±1,8)	8–9 (8,7±0,5)	hustě ochlupený	hruškovitý až subklavátní
<i>A. conicus</i>	4–5,5 (4,5±0,9)	8–13 (10,5±2,5)	8,5–10 (9,2±1,5)	mírně ochlupený	lžicovitý (spatulate) až klavátní
<i>A. conicus</i> „sp. 2“	4–6 (4,8±0,8)	7–13 (10,6±2,7)	8,5–11 (9,7±1)	hustě ochlupený	lžicovitý (spatulate) až klavátní
<i>A. conicus</i> „sp. 3“	4–6 (4,2±0,9)	8–14 (10,2±2,1)	8,5–11,5 (8,6±1,7)	hustě ochlupený	lžicovitý (spatulate) až elipsoidní
<i>A. gracilis</i>	3–5 (4,1±0,5)	6,5–9 (8±0,7)	7,5–9 (8,7±0,6)	hustě ochlupený	lžicovitý (spatulate)
<i>A. vitricola</i>	4,5–6 (5,1±0,6)	7–12 (9,6±1,7)	8–10 (9,1±0,7)	hladký	lžicovitý (spatulate)
<i>A. vitricola</i> „sp. 2“	6–8 (6,9±0,8)	16–22 (19,9±2,3)	7–9 (8,5±1)	hladký	hruškovitý
<i>A. penicilliioides</i>	4–6 (5,1±0,9)	10–18 (13,5±2,3)	8–10 (9,3±1,7)	mírně ochlupený	hruškovitý
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 2“	5–8 (6±1,2)	14–19 (16,4±3,3)	8–11 (8,9±1,2)	mírně ochlupený	lžicovitý (spatulate) až elipsoidní
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 3“	6–9 (6,6±0,5)	14–19 (16,5±1,3)	8–10 (9,3±0,7)	mírně ochlupený	lžicovitý (spatulate) až elipsoidní
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 4“	5–7 (6±1)	14–20 (16,3±3,2)	9–11 (9,3±0,8)	mírně ochlupený	hruškovitý
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 5“	5–7 (5,9±1,2)	17–22 (21,4±3,2)	9–11 (9,6±0,8)	mírně ochlupený	hruškovitý

Tabulka 7. Charakteristika konidioforů u druhů *Aspergillus* sekce *Restricti*.

druh	barva kolonie na M40Y	konidiální hlavice
<i>A. restrictus</i>	středně modrozelená (164) až světle modrozelená (163) s bílým (263) okrajem	sloupcovité, kompaktní, velmi dlouhé, spirálovité
<i>A. caesiellus</i>	bílá s tmavě modrozeleným (165) středem a okrajem	sloupcovité, kompaktní, spirálovité
<i>A. caesiellus</i> „sp. 2“	středně modrozelená (164) s bílým (263) okrajem	sloupcovité, kompaktní, spirálovité
<i>A. conicus</i>	světle zelenomodrá (172) s bílým (263) okrajem	sloupcovité, volné, spirálovité
<i>A. conicus</i> „sp. 2“	světle zelenomodrá (172) s bílým (263) okrajem	sloupcovité, volné, spirálovité
<i>A. conicus</i> „sp. 3“	středně modrozelená (164) s bílým (263) okrajem	sloupcovité, volné, spirálovité
<i>A. gracilis</i>	velmi světle zelenomodrá (171) s bílým (263) okrajem	sloupcovité, volné i kompaktní, spirálovité, zohýbané
<i>A. vitricola</i>	světle zelenomodrá (172) s bílým (263) okrajem	radiální
<i>A. vitricola</i> „sp. 2“	typ 1: velmi světle zelenomodrá (171) typ 2: silně žlutozelená (131) se středně žlutozeleným (136) středem a bílým (263) okrajem	radiální
<i>A. penicilliioides</i>	světle zelená (144) s bílým (263) okrajem	globózní
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 2“	typ 1: světle zelenomodrá (172) s bílým (263) okrajem typ 2: růžovobílá (9) s velmi světle zeleným (143) středem	globózní až radiální
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 3“	středně modrozelená (164) s velmi světle modrozeleným (162) středem a bílým (263) okrajem	globózní až radiální
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 4“	středně modrozelená (164) s bílým (263) okrajem	globózní
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 5“	světle modrozelená (163) s velmi světle modrozeleným (162) středem a bílým (263) okrajem	globózní až radiální

**Tabulka 8.** Barva kolonií a typ konidiálních hlavic jednotlivých druhů. V závorkách jsou uvedeny čísla barev podle systému ISCC-NBS (Kelly 1964).

druh	růst na médiu				Optimální médium
	MEA	CYA	CY20S 30 °C	M60Y 37 °C	
<i>A. restrictus</i>	++	++	++	+++	M40Y
<i>A. caesiellus</i>	++	++	+++	+++	M40Y
<i>A. caesiellus</i> „sp. 2“	++	++	++	+++	M60Y
<i>A. conicus</i>	+	+	-	-	M40Y
<i>A. conicus</i> „sp. 2“	-	+	-	-	MEA 10% NaCl
<i>A. conicus</i> „sp. 3“	+	+	-	-	M60Y
<i>A. gracilis</i>	-	+	-	-	M40Y
<i>A. vitricola</i>	-	-	-	-	M60Y
<i>A. vitricola</i> „sp. 2“	+	+	+	+	M40Y
<i>A. penicilliioides</i>	+	+	++	+++	M40Y, M60Y, MEA + 10% NaCl
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 2“	-	-	-	-	M60Y
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 3“	-	-	-	++	M40Y, M60Y
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 4“	+	+	+	+	M40Y
<i>A. penicilliioides</i> „sp. 5“	-	-	-	-	M60Y

**Tabulka 9.** Schopnosti růstu jednotlivých druhů na různých médiích. Kultivace probíhala 14 dní. Schopnost růstu je rozdělena do kategorií 0 mm (-), 0-10 mm (+), 10-20 mm (++), více než 20 mm (+++).

## 4 Diskuze

### 4.1 Molekulárně fylogenetická analýza

#### 4.1.1 „Objevení druhů“ (species discovery)

Molekulárně fylogenetická analýza byla v této práci provedena podle doporučení, která uvedli Carstens *et al.* (2013). Z tohoto důvodu bylo použito několik metod ve fázi „objevení druhů“ (species discovery), které byly vzájemně porovnány.

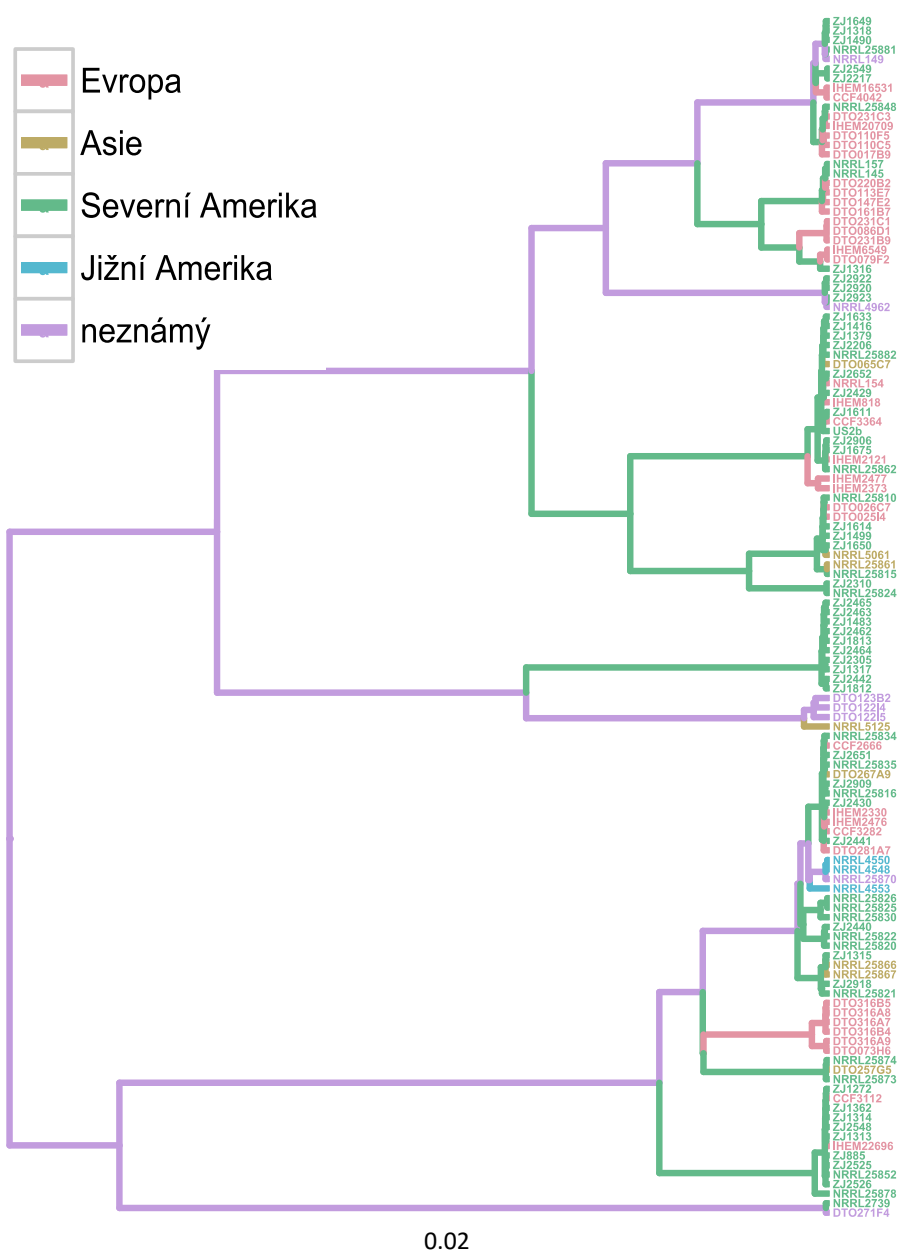
Za nejpokročilejší z těchto metod může být považována Stacey (Jones 2016), která vytváří rozdělení do druhů na základě multilokusového alignmentu. Pro každý lokus je také možné nastavit vlastní model evoluce i molekulární hodiny.

Nejpokročilejší z jednogenových metod je bGMYC (Reid et Carstens 2012), která pracuje s libovolně velkým souborem ultrametrických stromů (tzn. stromu, u kterého jsou všechny cesty od terminálních nodů ke kořenu stejně dlouhé). Výsledky této metody byly velice stabilní napříč testovanými lokusy a nejvíce ze všech jednogenových metod odpovídaly výsledkům Stacey. Metoda GMYC (Fujisawa et Barraclough 2013) bývá označována jako náchylná k „oversplittingu“ (rozdělování na příliš mnoho druhů). V této analýze se však tento problém ukazoval ve větší míře při analýze metodou PTP (Zhang *et al.* 2013). To je však nejspíš způsobeno chybou v metodice. Výhodou metody PTP oproti GMYC je mimo jiné to, že jako vstupní data pro analýzu nevyžaduje ultrametrický strom. V této práci byl pro analýzu PTP použit ultrametrický strom kvůli předpokladu, že tento strom je přesnější než stromy vytvořené metodami maximum likelihood. Tang *et al.* (2014) však tvrdí, že přesnější výsledky rozdělení druhů jsou získávány při použití stromů, které nejsou ultrametrické. Je tedy možné, že kdyby byly jako vstupní data pro metodu PTP použity stromy získané metodou maximum likelihood, nebo programem MrBayes (Ronquist et Huelsenbeck 2003) nedocházelo by ve výsledku k rozdělení na tolik druhů jako v této práci. Když se ale podíváme na to, které skupiny izolátů byly označeny jako druhy ve všech čtyřech lokusech, uvidíme, že výsledek se velmi podobá výsledkům získaným metodou Stacey.

Metoda ABGD (Puillandre *et al.* 2012) nepoužívá jako vstupní data stromy, ale pouze matici vzdáleností. Jedná se tedy o jednodušší metodu, která je vhodná především pro rychlou analýzu rozsáhlých datasetů s mnoha izoláty. Výsledky získané analýzou jednotlivých lokusů byly velmi nevyrovnané. Při analýze genu pro RPB2 ale produkovala tato metoda podobné výsledky jako Stacey.

Metoda Geneland většinou nebývá používána pro analýzu sekvencí DNA. Nepoužívá žádné modely evoluce, pracuje pouze s variabilními pozicemi v alignmentu, které rozdělí jako jednotlivé alely. Z tohoto pohledu se dá označit za nejjednodušší z použitých metod. Její výhoda je v možnosti kombinace různých typů dat a také kombinace s geografickou polohou izolátů (místem, kde byly

kmeny izolovány). Geografie však nemá na mezidruhové úrovni v sekci *Restricti* žádný význam, což můžeme vidět na obrázku 24. Většina druhů má pravděpodobně kosmopolitní rozšíření. V rámci některých druhů se vyskytují izoláty pocházející z několika různých kontinentů (*A. penicillioides* s. str. zahrnuje izoláty z Evropy, Asie, Jižní i Severní Ameriky). Analýza metodou Geneland přinesla nejstabilnější výsledky, počet rozlišených druhů byl ale výrazně nižší než u jakékoli jiné metody. Dá se říci, že byly rozlišeny pouze druhové komplexy, ale ne druhy uvnitř těchto komplexů.



**Obrázek 24.** Fylogenetický strom znázorňující původ izolátů. Koncové větve stromu jsou barevně rozděleny podle kontinentu, ze kterého izolát pochází.

#### 4.1.1 Druhy zastoupené jediným izolátem (singleton species)

Důležitým předpokladem všech metod použitých ve fázi „objevení druhů“ ale i ve zbývajících fázích fylogenetické analýzy je nepřítomnost, nebo alespoň nízký počet druhů tvořených pouze jedním izolátem (tzv. singleton species) a přibližně rovnoměrné rozdělení izolátů mezi jednotlivé druhy (každý druh by měl být tvořen zhruba stejným počtem izolátů, v ideálním případě by i vnitrodruhová variabilita jednotlivých druhů měla být zhruba stejná) (Carstens *et al.* 2013). Z pohledu na fylogenetický strom (např. obrázek 7) je jasné, že tyto předpoklady nebyly zcela splněny a rozložení izolátů mezi jednotlivé druhy rozhodně není rovnoměrné. Ve stromě se sice nevyskytuje žádný druh zastoupený pouze jedním izolátem, pro druhy *A. caesiellus* „sp. 2“ a *A. halophilicus* byly však k dispozici pouze dva izoláty s identickými sekvencemi. Na druhou stranu to ale neznamená, že získané výsledky ztrácejí smysl. Problém s nedostatečným vzorkováním je obecným jevem, který se vyskytuje v taxonomii velké části živých organismů (Ahrens *et al.* 2016). Rozšířené vzorkování v dalších geografických oblastech by jistě vedlo k získání většího počtu izolátů od každého druhu a navýšení genetické variability v rámci druhů. Pravidelně se však také objevují izoláty, které jsou natolik vzdálené od všech dosud známých druhů, že mohou být okamžitě považovány za druh nový (některé takové izoláty byly z této práce vyloučeny). Dá se říci, že dostupné izoláty zatím zdaleka nepokrývají celkovou variabilitu této skupiny. Ani to však není důvod pro nepožití moderních metod druhové delimitace. Tyto metody se v současnosti rychle vyvíjejí a jsou používány pro stále více skupin organismů, proto je vhodné začít je používat také u rodu *Aspergillus*. Další studie v budoucnu mohou navázat na tuto práci a porovnávat výsledky s již dostupnými daty.

#### 4.1.2 „Potvrzení druhů“ (species validation)

##### 4.1.2.1 BP&P

Analýza v programu BP&P je časově náročná. To je hlavním důvodem, proč nebyly vyzkoušeny všechny možnosti nastavení, i když analýza nepřinesla očekávané výsledky. V této práci byl použit přístup, který uplatnili například Saag *et al.* (2014), tedy porovnání různých modelů rozdělení izolátů do potenciálních druhů. Výsledky však nejsou zajímavé, protože modely s více druhy (tzv. split approach“) i modely s méně druhy (tzv. „lump approach“) byly 100% podpořeny i při různých nastaveních parametrů  $\tau$  (čas mezi speciacemi) a  $\theta$  (parametr velikosti populací). To může být způsobeno několika příčinami. První možností je, že rozdělení do 15 druhů vytvořené ve fázi „objevení druhů“ je nedostatečné a soubor izolátů použitý v této práci by měl být rozdělen na ještě více druhů. I kdyby to ale byla pravda, nebylo by takové rozdělení příliš praktické, protože už při rozdělení vytvořeném v této práci je problematické nalézt pro nové druhy fenotypové znaky, podle kterých by bylo možné je

navzájem odlišit. Druhou možností je nedostatečné vzorkování. Je možné, že výsledky analýzy jsou zkreslené nedostatkem variability uvnitř jednotlivých druhů. Další možným zdrojem nepřesností je špatně odhadnutý druhový strom. Tato možnost je nepravděpodobná, protože většina druhů byla silně podpořena při tvorbě druhového stromu v programu \*BEAST (s výjimkou druhů *A. penicilliioides* „sp. 2“ a *A. penicilliioides* „sp. 3“ viz kapitola 7). Program BP&P také nabízí pouze model evoluce JC69 (Jukes et Cantor 1969), zatímco pro dataset použitý v této práci by však byl vhodnější komplikovanější model.

Jiné studie využívající program BP&P testují pouze jedno vybrané rozdělení izolátů při různých nastaveních parametrů  $\tau$  (čas mezi speciemi) a  $\theta$  (parametr velikosti populace). Tento přístup bylo možné použít samozřejmě i zde a konstatovat, že všechny druhy jsou 100% podpořené. Tímto způsobem však není využít celý potenciál této analýzy.

Hotaling *et al.* (2016) analyzovali data v tomto programu rozsáhlejším způsobem. Provedli mnoho nezávislých analýz, vždy pouze s dvěma nebo maximálně třemi potenciálními druhy. Tímto způsobem předešli problémům s nejistotou ohledně topologie druhového stromu a také byl v tomto případě dostačující model evoluce JC69. Kromě různých nastaveních parametrů  $\tau$  a  $\theta$  provedli autoři také analýzy s náhodným zařazením izolátů do obou potenciálních druhů, čímž ještě výrazněji otestovali nulovou hypotézu. Toto je zřejmě příklad nejlepšího způsobu využití celého potenciálu programu BP&P. Hotaling *et al.* (2016) a také některé další studie (Aydin *et al.* 2014, Grummer *et al.* 2014) kombinují použití programu BP&P s výpočtem bayesovských faktorů (bayes factors). Bayesovské faktory umožňují porovnání libovolných modelů, nevyžadují určení topologie druhového stromu a mohou porovnávat i modely, ve kterých je skupina izolátů zařazena do několika odlišných druhů, ne pouze „split“ a „lump“ přístupy, při kterých je skupina izolátů vždy buď rozdělena na dva menší druhy (split), nebo ponechána jako jeden větší druh (lump). Výpočet bayesovských faktorů je však výpočetně ještě náročnější (na běžném PC může analýza souboru izolátů použitého v této práci trvat zhruba měsíc), proto nebyl vůbec zařazen do této práce.

#### 4.1.2.2 GSI (Genealogical sorting index)

Hodnota *gsi* sedmi z 15 druhů rozlišených ve fázi „objevení druhů“ byla nižší než 1 (1 znamená 100% monofylii). Nejnižší hodnotou *gsi* však bylo 0,78 (*A. penicilliioides* „sp. 5“), což je stále velmi vysoké číslo. Výsledky permutačních testů navíc vyšly signifikantně pro všechny druhy (tzn., že je zamítnuta nulová hypotéza, že by vyšší hodnota *gsi*, než jaká byla získána v testu, byla pozorována náhodou). Je tedy možné říci, že na základě GSI byly všechny druhy podpořeny jako izolované linie. I k těmto výsledkům je tedy třeba přistupovat s určitou opatrností. GSI (genealogical sorting index) byl použit v mnoha studiích pro potvrzení druhového rozdělení (Bagley *et al.* 2015, Esposito *et al.* 2015, Vigalondo



*et al.* 2015). I zde se však začínají objevovat názory, že skupiny podpořené tímto způsobem nejsou ve skutečnosti izolované populace bez genového toku (Winter *et al.* 2016).

## 4.2 Mikromorfologie

Počet dostupných fenotypových znaků v sekci *Restricti* je poměrně nízký. To samozřejmě limitovalo i možný přínos zde použité lineární diskriminační analýzy, která ale přesto v rámci některých komplexů podpořila rozeznání řady druhů, včetně některých problematických z hlediska molekulárně fylogenetické analýzy (viz kapitola 3.2 příklad *A. penicillioides*). Jednoznačné rozdělení do druhů rozeznávaných molekulárně fylogenetickou analýzou ale na základě těchto znaků není možné. V kombinaci s fyziologickými charakteristikami a makromorfologií (viz níže) se ale povedlo nalézt podporu pro všechny druhy rozlišené molekulárními metodami.

Další možností, která zde nebyla využita, je pokusit se provést křížící experimenty mezi opačně laděnými izoláty, které by vedly k vytvoření pohlavního stadia. Poté by bylo možné měřit další znaky na plodnicích a askosporách. Pohlavní systém v sekci *Restricti* prozatím nebyl zkoumán, a proto předpoklad o heterothalické povaze druhů vyplývá spíše ze zkušeností z jiných sekcí rodu *Aspergillus*. Poměrně značná genetická variabilita v rámci některých druhů (*A. penicillioides* s. str.) je také typická pro heterothalické druhy spíše než pro homothalické.

Vzhledem k překrývajícím se fenotypovým znakům u řady druhů představují molekulární metody (zejména sekvenace DNA) metodu volby při určování druhů sekce *Restricti*. Tato studie navíc rozhodně nezahrnuje konečný počet druhů v sekci a v budoucnu budou jistě objeveny další druhy. I z tohoto hlediska je tedy vhodné provádět identifikaci pomocí sekvenace a výsledky porovnávat s již dostupnými daty.

## 4.3 Schopnost růstu v osmotickém gradientu

Schopnost růstu v osmotickém a teplotním gradientu byla testována zejména z hlediska jejího využití jako taxonomického znaku. Výsledkem neměly být dokonalé růstové křivky, jejichž vytvoření by mohlo například pomoci v určení minimální a maximální vodní aktivity substrátu nutné k růstu. Tento údaj by mohl být cenný např. pro potravinářský průmysl, kde by určitá vodní aktivita komodit zabránila růstu těchto hub, které je běžně znehodnocují. V této práci však šlo především o nalezení taxonomických znaků, které by dokázaly rozlišit jednotlivé druhy v sekci.

Základním požadavkem spolehlivého taxonomického znaku je jeho stabilita. Schopnost růstu při různé vodní aktivitě se ukázala jako velmi stabilní při opakovaném testování stejného izolátu. Růstové křivky různých izolátů stejných druhů se stejným genotypem si ve většině případů také odpovídaly. Výsledky izolátů s různým genotypem patřících do stejného druhu však byly v mnoha případech variabilní. Tato variabilita může být následkem několika příčin, například stářím izolátu, substrátem, ze kterého byl kmen izolován, apod. Do jaké míry se jednotlivé faktory na vzniku této variability podílejí, není možné s jistotou říci.

Přestože se ukázalo, že se nejedná o naprosto stabilní znak a není možné tímto způsobem rozlišit všechny druhy, několik druhů bylo právě tímto způsobem jednoznačně odlišeno od jiných blízce příbuzných druhů. Dalším závěrem, který lze ze získaných dat učinit, je fakt, že všechny druhy lze jednoznačně označit za osmofilní, protože optimální vodní aktivita substrátu pro jejich růst je nižší než 1. Nejvíce osmofilními druhy v této sekci (tzn. druhy, které nejrychleji rostou při nejnižší testované vodní aktivitě) jsou druhy *A. penicilliioides* s. str., *A. penicilliioides* „sp. 2“ a *A. penicilliioides* „sp. 3“. Tyto druhy by mohly být vhodnými modelovými organismy pro studium osmotolerance v rámci celé říše Fungi. Naprosto specifickým druhem je *A. halophilicus*. Tento druh se podařilo kultivovat pouze na médiu CZ70S s extrémním obsahem sacharózy (700g/l). I na tomto médiu však rostl velice pomalu.

#### 4.4 Starý a nový koncept sekce *Restricti*

Jako první byl ze sekce *Restricti* popsán *A. penicilliioides* z cukrové třtiny (Spegazzini 1896), popisy tří dalších druhů byly publikovány v následujících dvou desetiletích, a sice *A. caesiellus* byl popsán v roce 1904 z ovzduší v Tokiu (Saito 1904), *A. gracilis* v roce 1907 z houby *Monilinia fructigena* (Bainier 1907) a *A. conicus* z křídovité půdy v roce 1914 (Blochwitz). Popisy byly publikovány bez jasného určení typu a byly vytvořeny na základě kultur pěstovaných na médiích, která jsou z dnešního pohledu suboptimální, přičemž právě médium použité pro kultivaci má velký vliv na mikro i makromorfologii druhů sekce *Restricti*.

Z tohoto důvodu není příliš možné porovnat originální popisy těchto druhů s měřeními získanými v této práci. Thom a Church (1926) považovali druhy *A. penicilliioides*, *A. gracilis* a *A. conicus* za přechodné formy mezi skupinami *A. glaucus* a *A. fumigatus*. Smith (1931) popsal druh *A. restrictus* a všechny druhy (s výjimkou druhu *A. caesiellus*) zařadil do skupiny *A. penicilliioides*. Fotografie dlouhých sloupcovitých konidiálních hlavic druhu *A. restrictus* vyobrazené autorem přesně vystihují tento charakteristický znak celého komplexu *A. restrictus* ve smyslu této práce (viz příloha, obr. P1). Také popisy druhů *A. penicilliioides* a *A. conicus* odpovídají poměrně přesně druhovým komplexům rozeznávaným v této práci, co se týká rozměrů měchýřků, stonků a konidií. Popis druhu *A. gracilis* se mírně liší v rozměru měchýřků, ale mikroskopické fotografie

jsou také ve shodě s touto prací. V další studii označili Thom a Raper (1945) zmíněné druhy jako tzv. sérii v rámci skupiny *A. glaucus*. Poslední dva druhy řazené do sekce byly popsány s poměrně dlouhým časovým odstupem. V roce 1959 byla nejprve popsán druh *A. halophilicus* (jako *Eurotium halophilicum*) ze semen pšenice (Christensen *et al.* 1959). Posledním popsáným druhem byl *A. vitricola*, který popsal Ohtsuki z čočky binokulární lupy (Ohtsuki 1962). V originálním popisu se vyskytuje tvar *A. vitricolae*, což je ovšem gramaticky špatná forma. Popis je vytvořen na základě kultury na CZ + 10% NaCl (Czapek agar + 10% NaCl), což může způsobit odlišnosti v morfologii, i tak je ale s podivem, že se v popisu vyskytují sloupcovité konidiální hlavice, když právě *A. vitricola* je typickým příkladem druhu tvořícího radiální hlavice (autentický kmen byl k dispozici v této práci).

Skupinu *A. restrictus* („*A. restrictus group*“) zavedli Raper a Fennell (1965). Přestože nejstarším popsáným druhem je *A. penicillioides*, autoři se rozhodli skupinu pojmenovat podle druhu, který považovali za nejvýznamnější. V této práci již byl do skupiny zařazen i druh *A. caesiellus*. Naproti tomu *A. vitricola* byl autory považován za synonymum druhu *A. penicillioides*. Autoři také uvádějí, že mezi izoláty tohoto druhu je patrná určitá variabilita. Ex-typový kmen NRRL 154 se odlišuje od ostatních rychlostí růstu i mikromorfologickými znaky, což bylo pozorováno i v této práci (lineární diskriminační analýzou je řazen spíše mezi izoláty druhu *A. caesiellus*, viz kapitola 3.2, obr. 12). Dále autoři považovali kmen NRRL 145 za součást druhu *A. restrictus*, přestože pozorovali odlišnosti v morfologii a v dřívější práci jej Thom a Raper (1945) označili jako *A. gracilis*. V této práci byl kmen NRRL 145 molekulárními metodami zařazen do nepopsaného druhu *A. conicus* „sp. 3“ spolu s dalšími izoláty. Růstové parametry komplexů *A. restrictus* a *A. conicus* na médiích s nízkou vodní aktivitou jsou velmi odlišné, a proto zařazení izolátu NRRL 145 ke druhu *A. restrictus* podle Raper a Fennell (1965) je překvapivé a nepřesné. Jak molekulární, tak fyziologická a morfologická data totiž shodně podporují zařazení izolátu do komplexu *A. conicus*.

V roce 1985 byla provedena neotypifikace druhů a pro skupinu byla zavedena taxonomická hodnota sekce (Samson et Gams 1985). Pitt a Samson (1990) na základě morfologických znaků zredukovali počet druhů v sekci na tři, když zachovali pouze druhy *A. caesiellus*, *A. restrictus* a *A. penicillioides*. Přestože morfologická variabilita v sekci není velká, redukce na tři druhy neměla opodstatnění, protože např. druhy komplexu *A. conicus* se výrazně odlišují od druhu *A. restrictus*, se kterým byly synonymizovány.

Molekulárně fylogenetickou analýzu sekce provedl Peterson (2000) nejprve na základě sekvencí pro ribozomální DNA – LSU (large subunit, 28S) a poté na základě 4 lokusů (Peterson 2008). Tato analýza potvrdila existenci minimálně sedmi druhů a zahrnula druh *A. halophilicus*, který byl do té doby považován za součást sekce *Aspergillus* (dříve označované *Eurotium*). Všechny zmíněné studie

však byly provedeny s velmi omezeným počtem izolátů, např. v nejnovější fylogenetické studii (Peterson 2008) byla celá sekce zastoupena jen 12 izoláty.

Předkládaná práce je první rozsáhlou taxonomickou studií sekce *Restricti*, která kombinuje více taxonomických metod. Kromě molekulárně fylogenetických metod byly zhodnoceny i rozlišovací schopnosti dalších taxonomických znaků (viz tabulky 6, 7 a 8). Významným znakem pro rozlišení druhových komplexů je tvar konidiálních hlavic a dále oranamentace konidií a křivky růstu v osmotickém gradientu. Pro rozlišení druhů v rámci komplexů se jako vhodný znak kromě mikromorfologických znaků (viz kapitola 3.2) ukázaly schopnosti růstu na médiích s různou vodní aktivitou a při různých teplotách (viz tabulka 9). Přestože byl počet druhů patřících do sekce *Restricti* v této práci zdvojnásoben, dá se očekávat, že v budoucnu bude tento počet ještě navýšen. Genetické vzdálenosti mezi druhy jsou totiž vyšší než u jiných sekcí rodu *Aspergillus* a je pravděpodobné, že dosavadní vzorkování této sekce není dostatečné.

## 5 Závěr

V této práci byla provedena taxonomická revize sekce *Restricti*. Jedná se o specifickou skupinu osmofilních hub s malou morfologickou variabilitou, která vyžaduje speciální přístup. Kromě klasických morfologických metod byla tedy testována také možnost využití schopnosti růstu v osmotickém gradientu a také schopnost růstu na médiích s různou vodní aktivitou způsobenou přidáním různých osmoticky aktivních látek (sacharóza, sůl, glycerol) a při různých teplotách (25 °C, 30 °C, 37 °C). Kromě sedmi již dříve popsanych druhů bylo molekulárně fylogenetickými metodami rozlišeno osm nových druhů. Tento počet však téměř jistě není definitivní a v budoucnu budou v rámci této sekce popsány další druhy. Ačkoliv morfologická variabilita v sekci není velká, genetické vzdálenosti mezi jednotlivými druhy jsou větší než u jiných sekcí rodu *Aspergillus*. Nejvariabilnějším lokusem v sekci *Restricti* je  $\beta$ -tubulin, naopak nejnížší variabilitu má, stejně jako v jiných sekcích rodu *Aspergillus*, oblast rDNA (ITS a LSU). Pro vymezení druhů byly poprvé v rámci rodu *Aspergillus* použity metody založené na modelu mnohodruhové koalescence, ve kterých dochází v současné době k rychlému vývoji a je proto doporučeno testovat co nejvíce dostupných metod. V budoucnu bude jistě vhodné na tuto práci navázat a metodiku rozšířit zejména ve fázi „potvrzení druhů“ (species validation). Jako nejvhodnější z použitých fylogenetických metod založených na jednom genetickém lokusu lze na základě výsledků označit metodu bGMYC. Nejvíce nových druhů (čtyři) bylo rozlišeno v rámci komplexu *A. penicilliioides*. Všechny druhy se také podařilo kromě fylogenetické analýzy odlišit některou z fenotypových charakteristik. Za významné taxonomické znaky lze považovat tvar konidiálních hlavic, ornamentaci konidií, rozměry mikroskopických struktur a také schopnost (a případně rychlost) růstu na různých médiích a při různých teplotách. Velká část druhů se liší svou schopností růstu na médiích CY20S při 30 °C a M60Y při 37 °C. Další studium sekce *Restricti* by se mělo zaměřit mimo jiné na objasnění pohlavního systému a indukci pohlavního stádia, tedy osekvenování genů asociovaných s pohlavním cyklem (tzv. MAT-faktorů) a provedení křížících pokusů. Výsledky by ověřily možnost využití biologického konceptu druhu v sekci a pohlavní stádium by zároveň bylo zdrojem dalších taxonomických znaků.

## 6 Citovaná literatura

- Ahrens D, Fujisawa T, Krammer HJ, Eberle J, Fabrizi S, Vogler AP (2016). Rarity and Incomplete Sampling in DNA-Based Species Delimitation. *Syst Biol* **65**: 478-494.
- Ali I, Akbar A, Anwar M, Prasongsuk S, Lotrakul P, Punnapayak H (2015). Purification and characterization of a polyextremophilic  $\alpha$ -Amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents. *BioMed Res Int*.
- Aydin Z, Marcussen T, Ertekin AS, Oxelman B (2014). Marginal Likelihood Estimate Comparisons to Obtain Optimal Species Delimitations in *Silene* sect. *Cryptoneuræ* (Caryophyllaceae). *Plos One* **9**: 9.
- Bagley JC, Alda F, Breitman MF, Bermingham E, van den Berghe EP, Johnson JB (2015). Assessing Species Boundaries Using Multilocus Species Delimitation in a Morphologically Conserved Group of Neotropical Freshwater Fishes, the *Poecilia sphenops* Species Complex (Poeciliidae). *Plos One* **10**: 30.
- Bainier G (1907). Bulletin de la Société Mycologique de France. **23**: 90-93.
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* **5**: 1705-1712.
- Barker FK, Lutzoni FM (2002). The utility of the incongruence length difference test. *Syst Biol* **51**: 625-637.
- Bazinet AL, Cummings M (2008). The Lattice Project: a Grid research and production environment combining multiple Grid computing models. Distributed & Grid Computing—Science Made Transparent for Everyone. Principles, Applications and Supporting Communities: 2-13.
- Blochwitz A (1907). Annales Mycologici. **12**: 38.
- Bouckaert R, Heled J, Kuhnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol* **10**: 6.
- Bouckaert RR (2010). DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **26**: 1372-1373.
- Camargo A, Morando M, Avila LJ, Sites JW (2012). Species delimitation with ABC and other coalescent-based methods: a test of accuracy with simulations and an empirical example ewith lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). *Evolution* **66**: 2834-2849.
- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD (2013). How to fail at species delimitation. *Mol Ecol* **22**: 4369-4383.
- Cummings MP, Neel MC, Shaw KL (2008). A genealogical approach to quantifying lineage divergence. *Evolution* **62**: 2411-2422.
- de Hoog G, Guarro J, Gene' J, Figueras M (2009). Atlas of clinical fungi. 3rd CD-ROM ed. Utrecht, the Netherlands, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- De Queiroz K (2007). Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* **56**: 879-886.

- Degnan JH, Rosenberg NA (2006). Discordance of species trees with their most likely gene trees. *PLoS Genet* **2**: 762-768.
- Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW (2003). A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* **57**: 2703-2720.
- Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW (2006). Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia* **98**: 436-446.
- Esposito LA, Bloom T, Caicedo-Quiroga L, Alicea-Serrano AM, Sanchez-Ruiz JA, May-Collado LJ, Binford GJ, Agnarsson I (2015). Islands within islands: Diversification of tailless whip spiders (Amblypygi, *Phrynus*) in Caribbean caves. *Mol Phylogenet Evol* **93**: 107-117.
- Flot JF (2015). Species Delimitation's Coming of Age. *Syst Biol* **64**: 897-899.
- Fontaneto D, Flot JF, Tang CQ (2015). Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Mar Biodivers* **45**: 433-451.
- Frankham R, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MDB, Fenster CB, Lacy RC, Mendelson JR, Porton IJ, Ralls K, Ryder OA (2012). Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biol Conserv* **153**: 25-31.
- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B 1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **28**: 442-453.
- Fujisawa T, Aswad A, Barraclough TG (2016). A rapid and scalable method for multilocus species delimitation using Bayesian model comparison and rooted triplets. *Syst Biol*: syw028.
- Fujisawa T, Barraclough TG (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Syst Biol*: syt033.
- Gams W, Christensen M, Onions A, Pitt J, Samson R (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, Springer. **102**: 55–62.
- Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the pcr to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1323-1330.
- Goncalves SS, Stchigel AM, Cano JF, Godoy-Martinez PC, Colombo AL, Guarro J (2012). *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Med Mycol* **50**: 152-160.
- Grummer JA, Bryson RW, Reeder TW (2014). Species Delimitation Using Bayes Factors: Simulations and Application to the *Sceloporus scalaris* Species Group (Squamata: Phrynosomatidae). *Syst Biol* **63**: 119-133.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Mol Ecol Notes* **5**: 712-715.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*.
- Heled J, Drummond AJ (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol Biol Evol* **27**: 570-580.

- Hey J (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends Ecol Evol* **21**: 447-450.
- Hocking AD, Pitt JI (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* **39**: 488-492.
- Hong SB, Cho HS, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 477-486.
- Hotaling S, Foley ME, Lawrence NM, Bocanegra J, Blanco MB, Rasoloarison R, Kappeler PM, Barrett MA, Yoder AD, Weisrock DW (2016). Species discovery and validation in a cryptic radiation of endangered primates: coalescent-based species delimitation in Madagascar's mouse lemurs. *Mol Ecol* **25**: 2029-2045.
- Hubka V, Kolařík M, Kubátová A, Peterson SW (2013). Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia* **105**: 912-937.
- Huelsenbeck JP, Bull JJ (1996). A likelihood ratio test to detect conflicting phylogenetic signal. *Syst Biol* **45**: 92-98.
- Christensen CM, Papavizas GC, Benjamin CR (1959). A new halophilic species of *Eurotium*. *Mycologia* **51**: 636-640.
- Jones G (2016). Algorithmic improvements to species delimitation and phylogeny estimation under the multispecies coalescent. *J Math Biol*: 1-21.
- Jukes TH, Cantor CR (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism* **3**: 132.
- Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**: 772-780.
- Kelly K (1964). Color-name charts illustrated with centroid colors. Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards, Chicago.
- Kingman JF (1982). On the genealogy of large populations. *J Appl Probab*: 27-43.
- Klich MA (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Centraalbureau voor schimmelcultures.
- Kobayashi N, Watanabe M, Hara-Kudo Y (2012). Distinctive identification of *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium halotolerans* based on physiological methods. *J Syst Evol* **50**: 235-243.
- Kozakiewicz Z (1989). *Aspergillus* species on stored products, CAB International Wallingford, UK.
- Kubatko LS, Carstens BC, Knowles LL (2009). STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics* **25**: 971-973.
- Kubatko LS, Degnan JH (2007). Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Syst Biol* **56**: 17-24.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*.
- Larget BR, Kotha SK, Dewey CN, Ane C (2010). BUCKy: Gene tree/species tree reconciliation with Bayesian concordance analysis. *Bioinformatics* **26**: 2910-2911.
- Larsson A (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* **30**: 3276-3278.

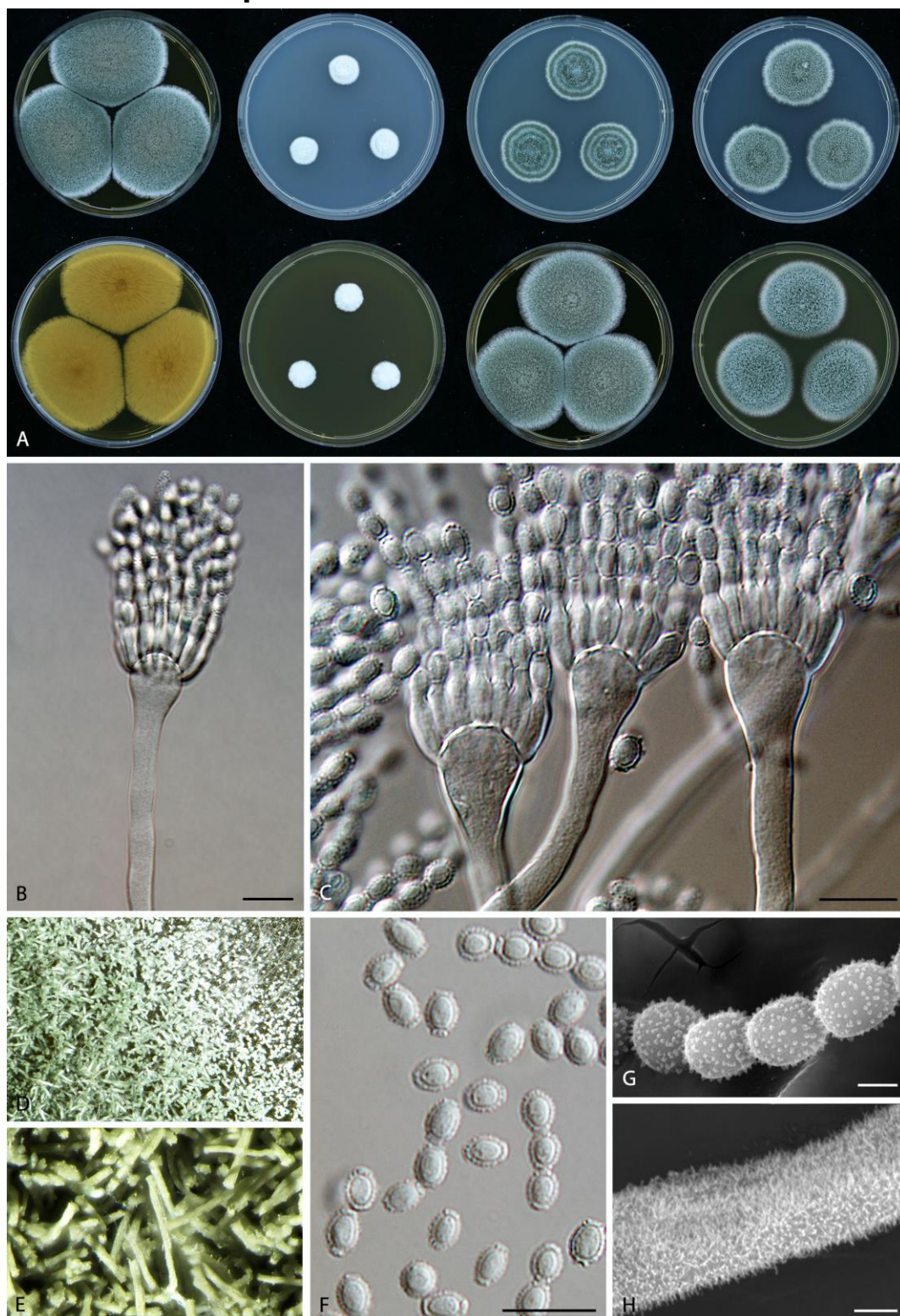


- Leache AD, Fujita MK (2010). Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc R Soc B-Biol Sci* **277**: 3071-3077.
- Leigh JW, Susko E, Baumgartner M, Roger AJ (2008). Testing congruence in phylogenomic analysis. *Syst Biol* **57**: 104-115.
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Lischer H, Excoffier L (2012). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* **28**: 298-299.
- Liu L (2008). BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics* **24**: 2542-2543.
- Liu L, Yu LL, Pearl DK, Edwards SV (2009). Estimating species phylogenies using coalescence times among sequences. *Syst Biol* **58**: 468-477.
- Liu YJJ, Whelen S, Benjamin DH (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* **16**: 1799-1808.
- Nováková A, Hubka V, Dudová Z, Matsuzawa T, Kubátová A, Yaguchi T, Kolařík M (2014). New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Divers* **64**: 253-274.
- O'donnell K (1993). *Fusarium* and its near relatives. Fungal holomorph : mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, Wallingford, C a B International.
- O'donnell K, Cigelnik E (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**: 103-116.
- Ohtsuki T (1962). Studies on the glass mould. V. On two species of *Aspergillus* isolated from glass. *The Botanical magazine, Tokyo* **75**: 436-442.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290.
- Peterson SW (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based upon rDNA sequence analysis. *In* Classification of *Penicillium* and *Aspergillus*: integration of modern taxonomic methods, Reading, UK: Harwood Publishers: 323-356.
- Peterson SW (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **100**: 205-226.
- Pitt J, Samson R (1990). Taxonomy of *Aspergillus* section *Restricta*. *In* Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, Springer: 249-257.
- Pitt JI (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc, London.
- Pitt JI, Hocking AD (2009). *Fungi and food spoilage*, Springer.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* **21**: 1864-1877.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria.

- Rambaut A, Suchard M, Xie D, Drummond A (2014). Tracer v1.6, dostupný online <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Raper KB, Fennell DI (1965). The genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins.
- Reid NM, Carstens BC (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evol Biol* **12**: 196.
- Rinyu E, Varga J, Ferenczy L (1995). Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **33**: 2567-2575.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Rosenberg NA (2013). Discordance of species trees with their most likely gene trees: A unifying principle. *Mol Biol Evol* **30**: 2709-2713.
- Saag L, Mark K, Saag A, Randlane T (2014). Species delimitation in the lichenized fungal genus *Vulpicida* (Parmeliaceae, Ascomycota) using gene concatenation and coalescent-based species tree approaches. *Am J Bot* **101**: 2169-2182.
- Saito K (1904). Untersuchungen über die atmosphärischen Pilzkeime. *J Fac Sci Coll Imp Univ Tokyo* **18**: 49–50.
- Samson R, Varga J, Witiak S, Geiser D (2007). The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Stud Mycol* **59**: 71-73.
- Samson RA, Gams W (1985). Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, Springer: 31-54.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2010). Food and indoor fungi, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Schwab CJ, Straus DC (2004). The roles of *Penicillium* and *Aspergillus* in sick building syndrome. *Adv Appl Microbiol* **55**: 215-238.
- Schwarzfeld MD, Sperling FAH (2015). Comparison of five methods for delimitating species in *Ophion Fabricius*, a diverse genus of parasitoid wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Mol Phylogenet Evol* **93**: 234-248.
- Sites JW, Marshall JC (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol* **18**: 462-470.
- Smith G (1931). The identification of fungi causing mildew in cotton goods: the genus *Aspergillus*-part II. *J Text I* **22**: T110-T116.
- Spegazzini C (1896). Hongos de la cana de azucar. *La Plata Univ Fac Agron y Vet Rev.* **2**: 227-258.
- Tang CQ, Humphreys AM, Fontaneto D, Barraclough TG (2014). Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. *Methods Ecol Evol* **5**: 1086-1094.
- Thom C, Church MB (1926). The *Aspergilli*, Williams & Wilkins.
- Thom C, Raper KB (1945). A Manual of the *Aspergilli*, Williams & Wilkins.
- Venables WN, Ripley BD (2002). Modern applied statistics with S. New York, Springer.
- Vigalondo B, Fernandez-Mazuecos M, Vargas P, Saez L (2015). Unmasking cryptic species: morphometric and phylogenetic analyses of the Ibero-North African *Linaria incarnata* complex. *Bot J Linnean Soc* **177**: 395-417.

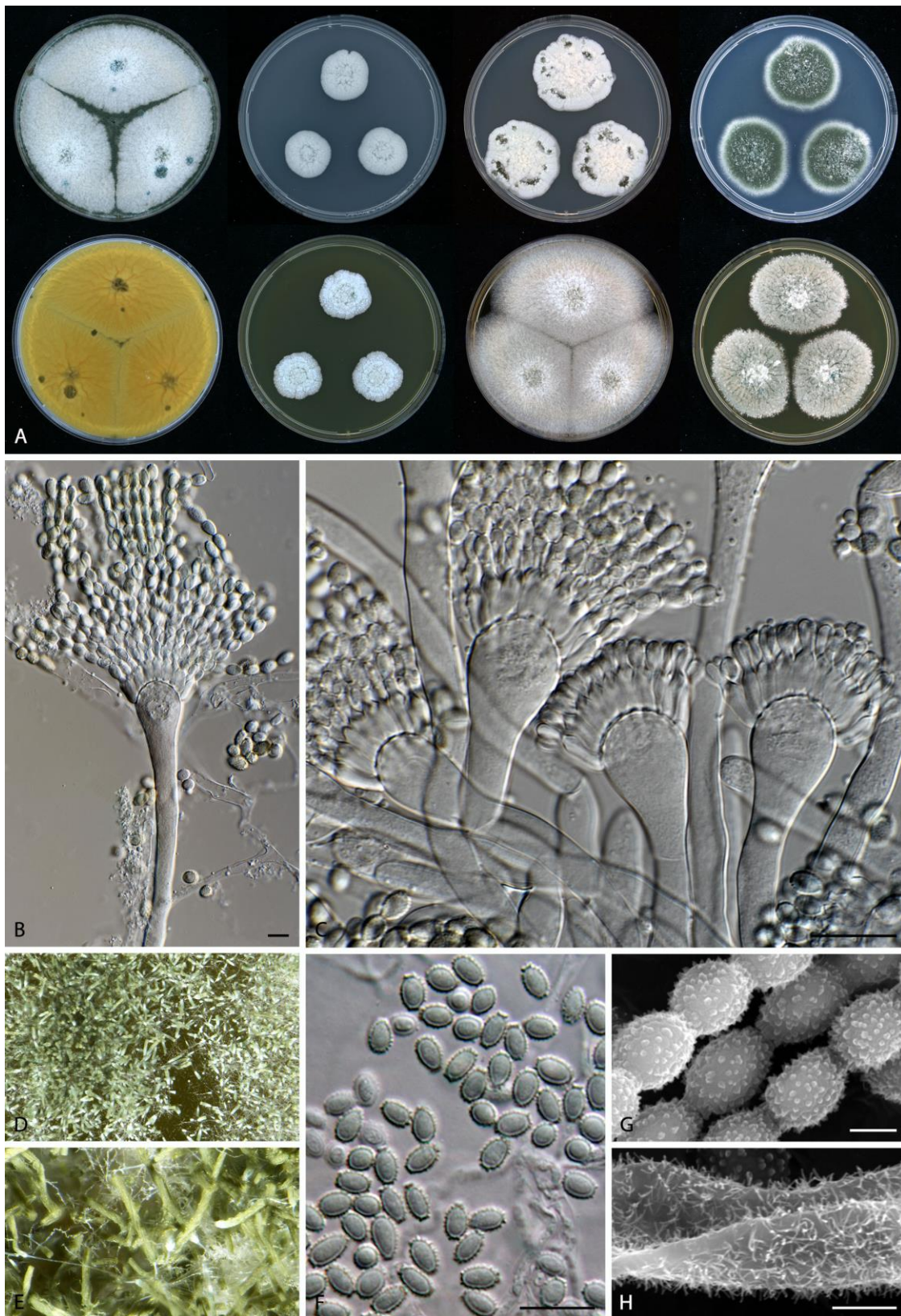
- Wang XW, Wadl PA, Wood-Jones A, Windham G, Trigiano RN, Scruggs M, Pilgrim C, Baird R (2012). Characterization of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers for *Aspergillus flavus*: emphasis on variability of isolates from the southern United States. *Mycopathologia* **174**: 371-382.
- Ward OP, Qin WM, Dhanjoon J, Ye J, Singh A (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. In *Adv Appl Microbiol*. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. **58**: 1-75.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes and the internal transcribed spacer in fungi. *PCR—Protocols and applications—a laboratory manual*. Academic Press, Orlando FL: 315-322.
- Wickham H (2009). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. New York, Springer-Verlag.
- Winter DJ, Trewick SA, Waters JM, Spencer HG (2016). The genealogical sorting index and species delimitation. *bioRxiv*: 036525.
- Wu YF (2012). Coalescent-based species tree inference from gene tree topologies under incomplete lineage sorting by maximum likelihood. *Evolution* **66**: 763-775.
- Yadav SK, Batra JK (2015). Ribotoxin restrictocin manifests anti-HIV-1 activity through its specific ribonuclease activity. *Int J Biol Macromolec* **76**: 58-62.
- Yang Z, Rannala B (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 9264-9269.
- Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Frank JM, Gunde-Cimerman N (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**: 311-328.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* **29**: 2869-2876.

## 7 Obrazová příloha



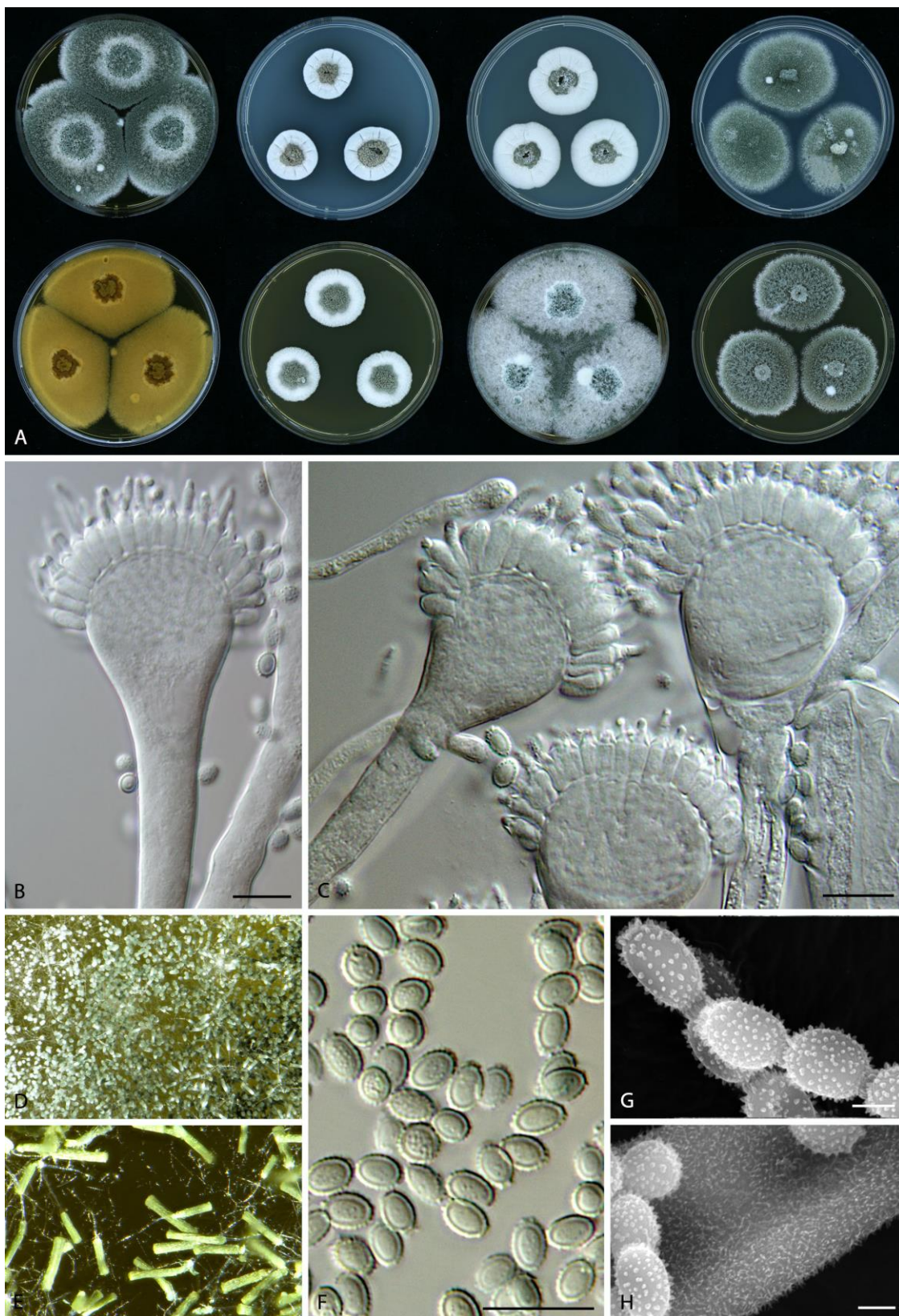
**Obrázek P1.** *Aspergillus restrictus*. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu\text{m}$ ; G, H = 2  $\mu\text{m}$ .





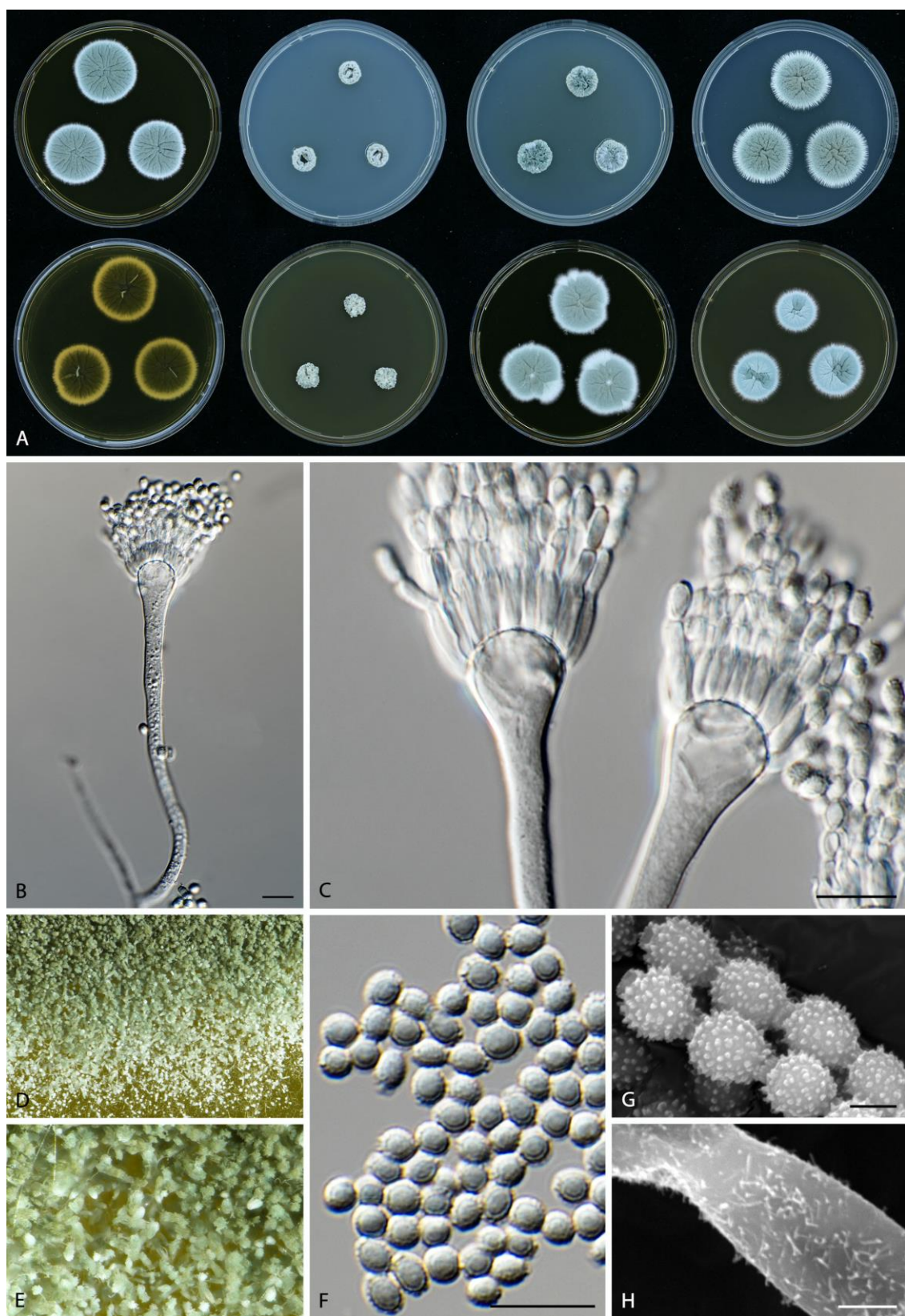
**Obrázek P2.** *Aspergillus caesiellus*. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.



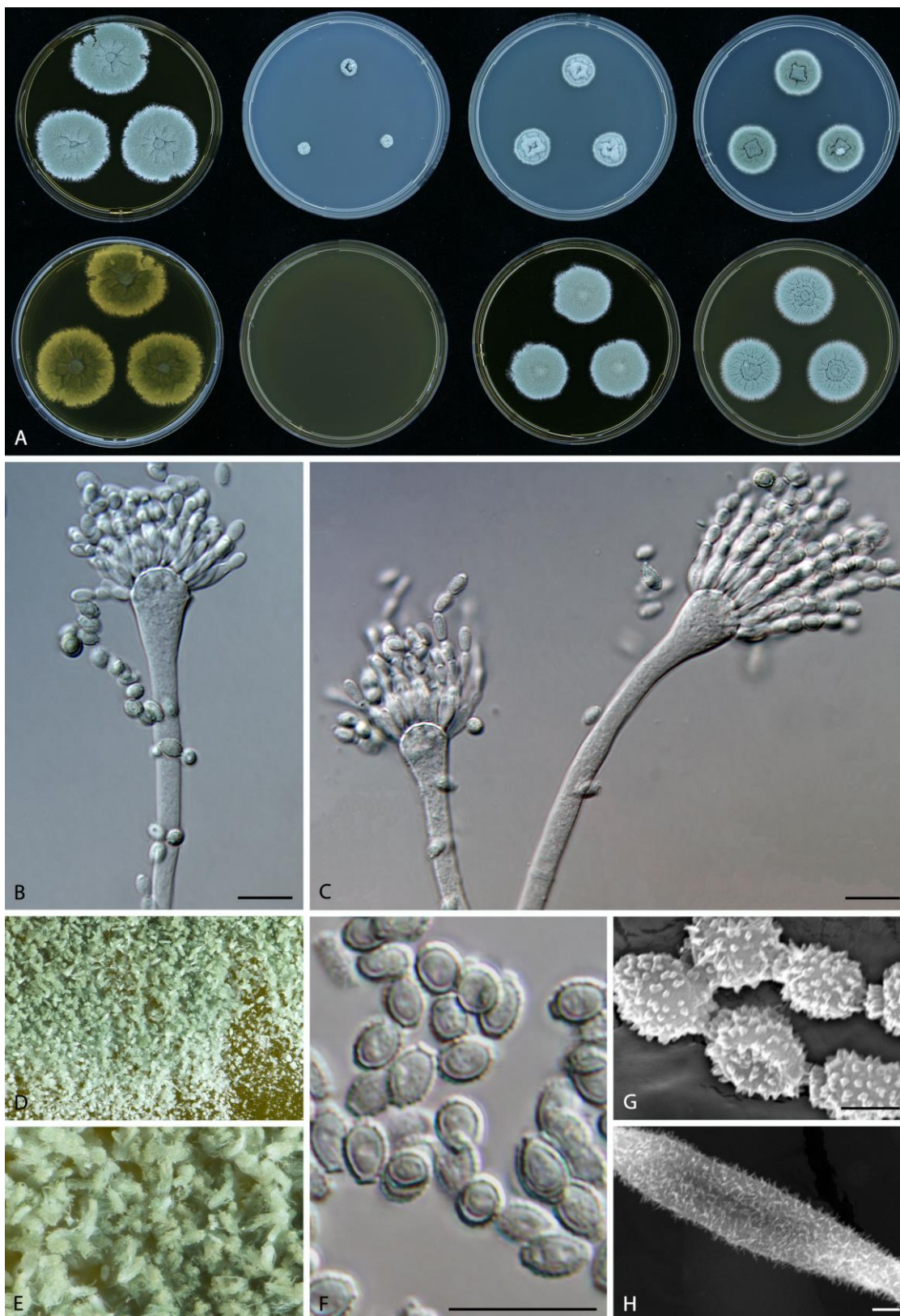


**Obrázek P3.** *Aspergillus caesiellus* „sp. 2“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.



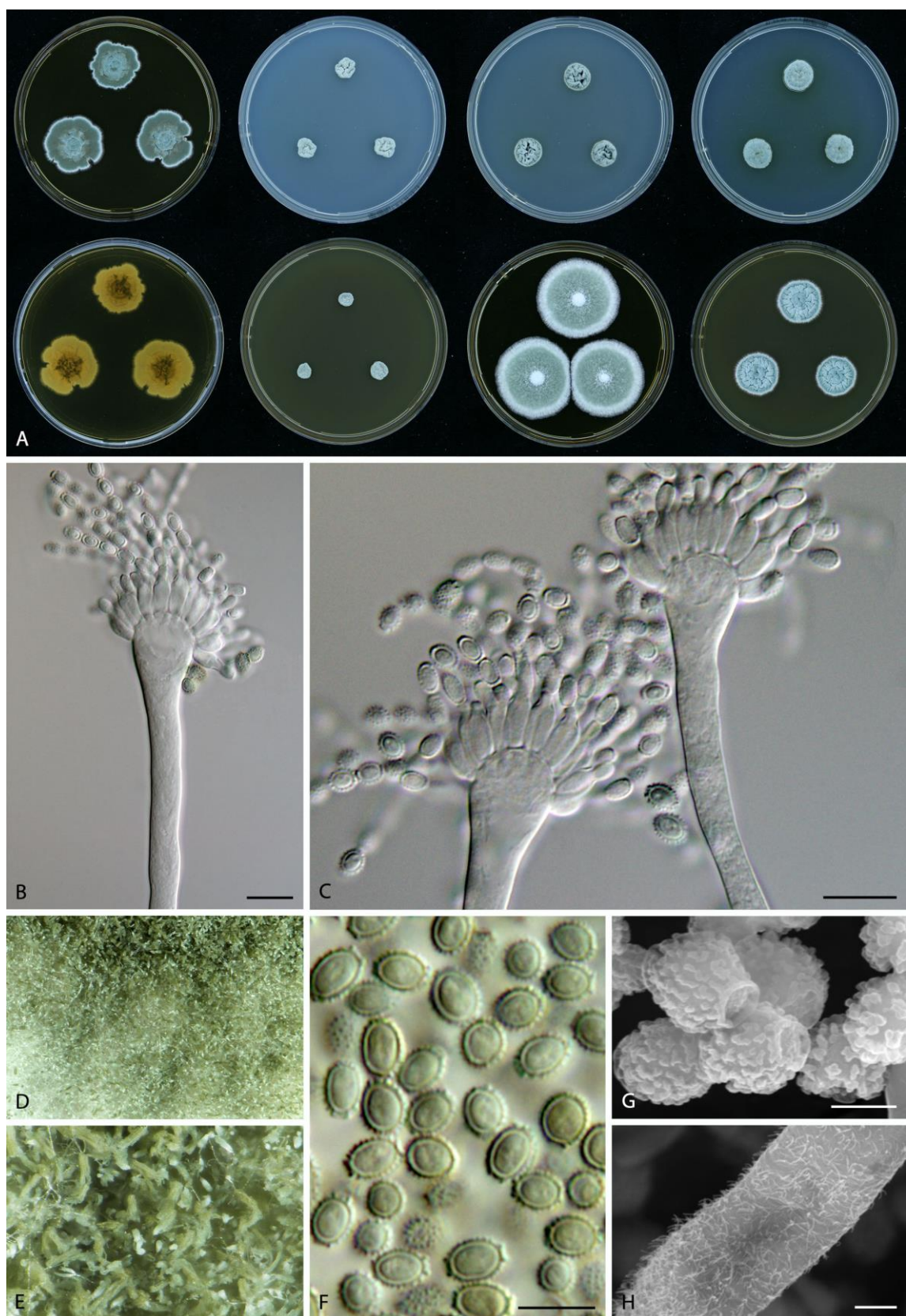


**Obrázek P4.** *Aspergillus conicus*. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.



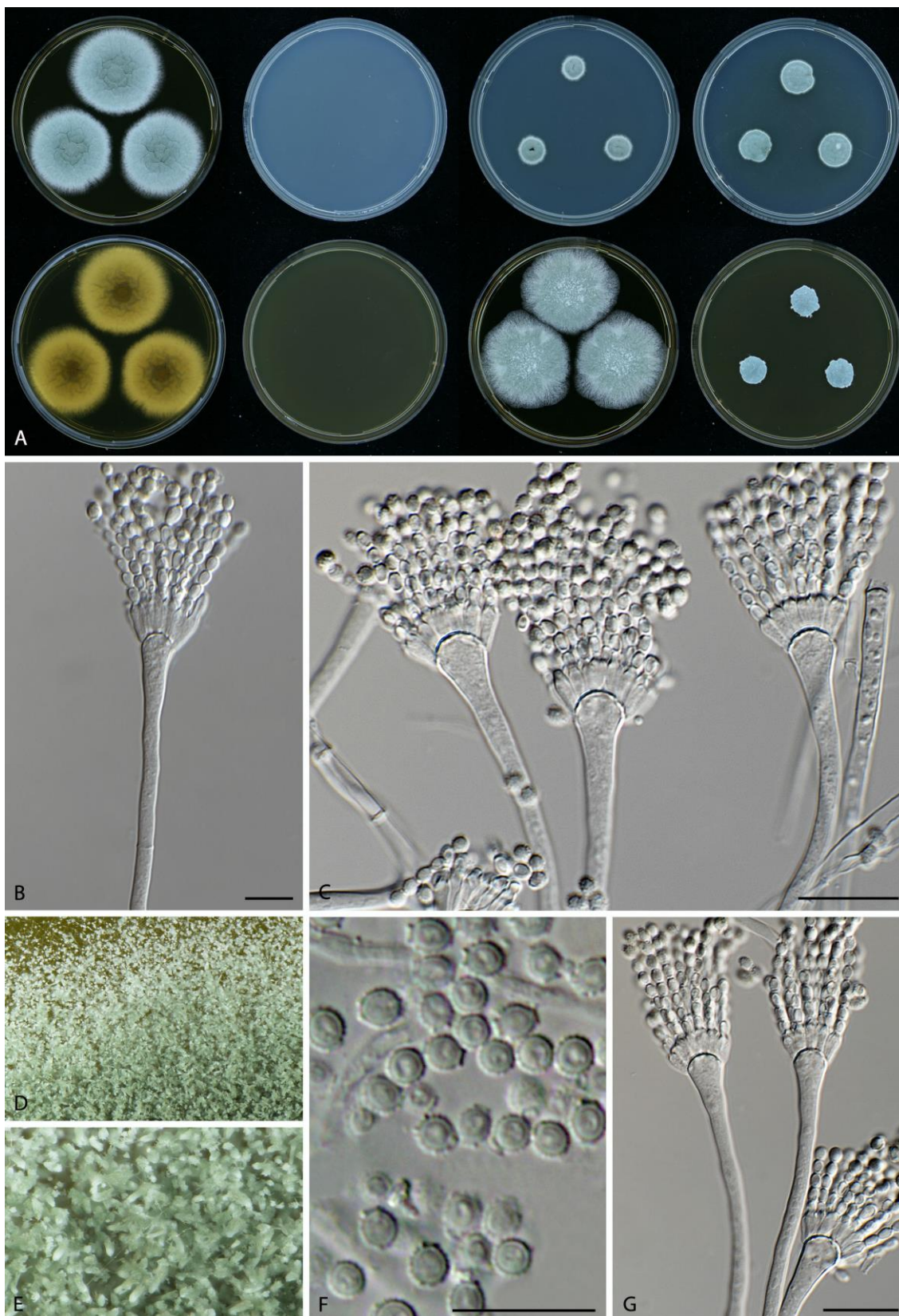
**Obrázek P5.** *Aspergillus conicus* „sp. 2“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu\text{m}$ ; G, H = 2  $\mu\text{m}$ .





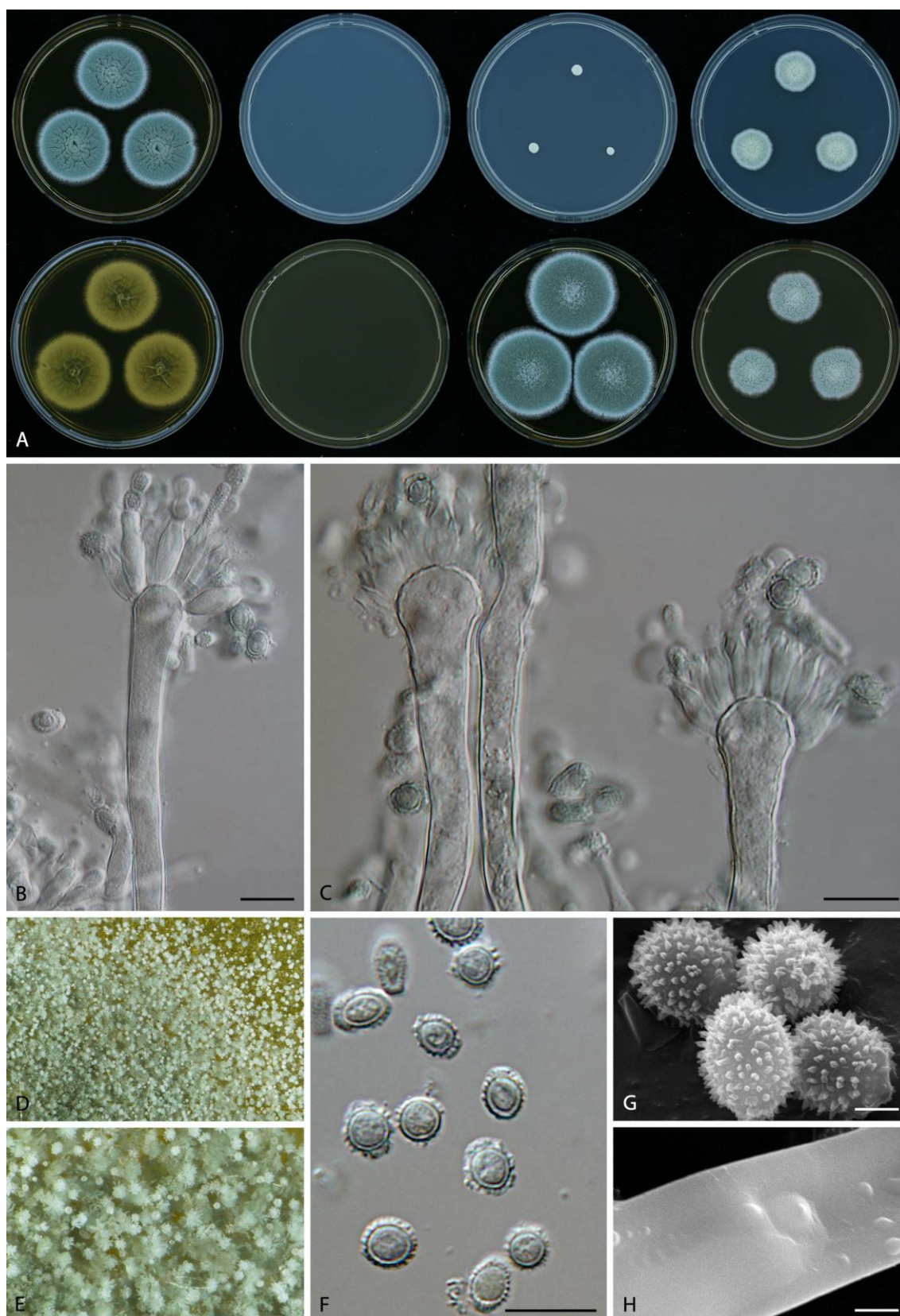
**Obrázek P6.** *Aspergillus conicus* „sp. 3“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu\text{m}$ ; G, H = 2  $\mu\text{m}$ .





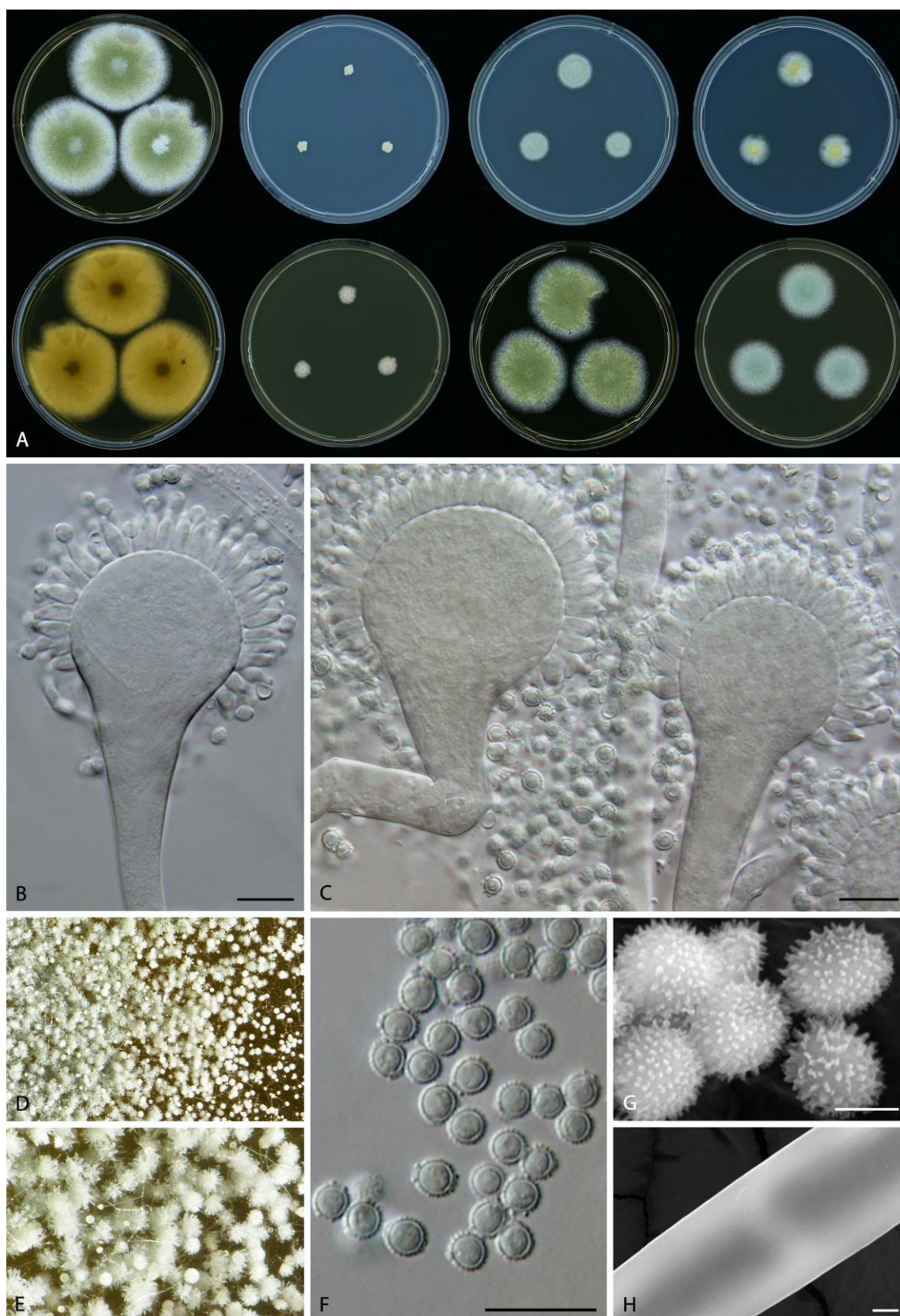
**Obrázek P7.** *Aspergillus gracilis*. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítko: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.





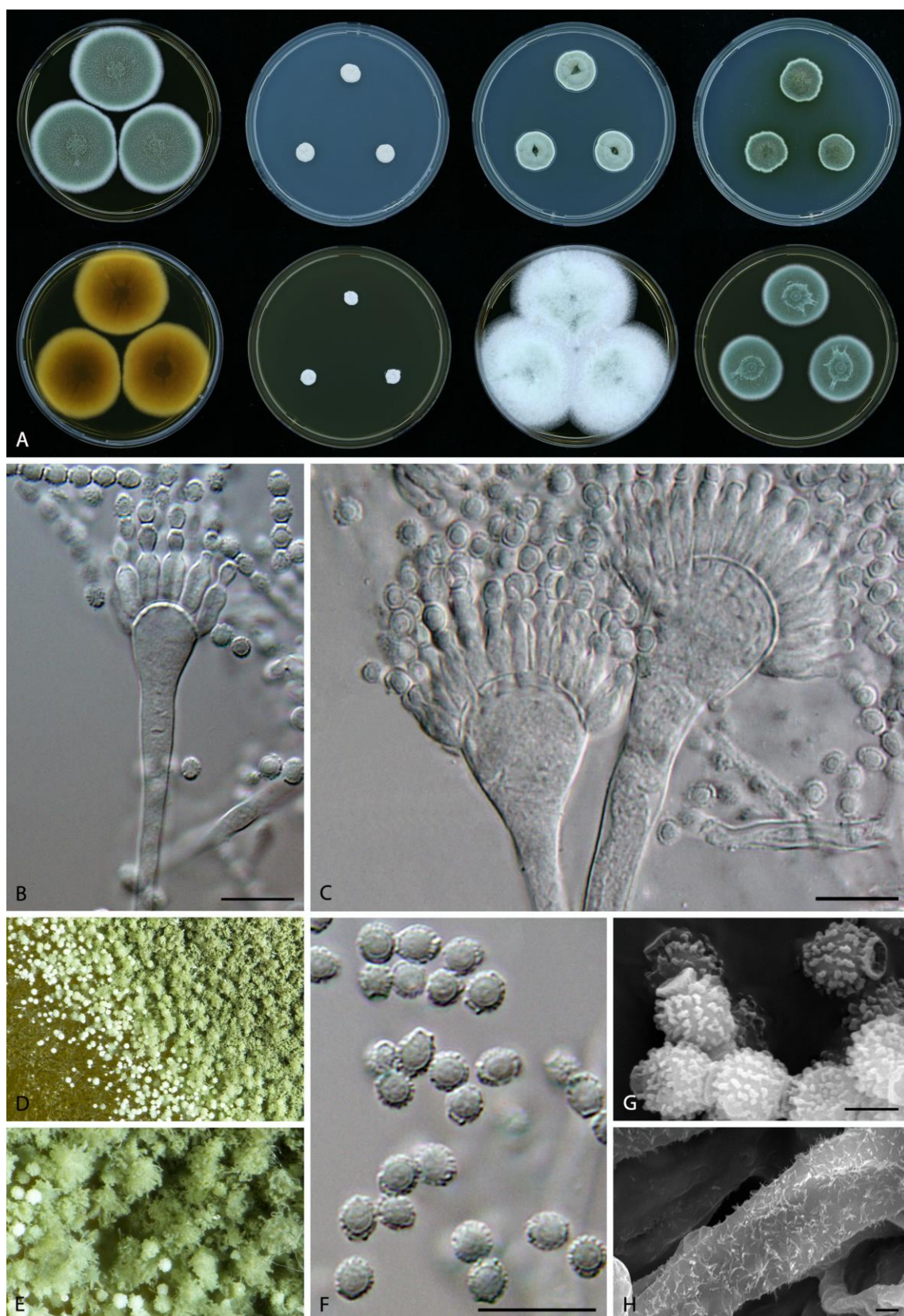
**Obrázek P8.** *Aspergillus vitricola*. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.





**Obrázek P9.** *Aspergillus vitricola* „sp. 2“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavičky. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.





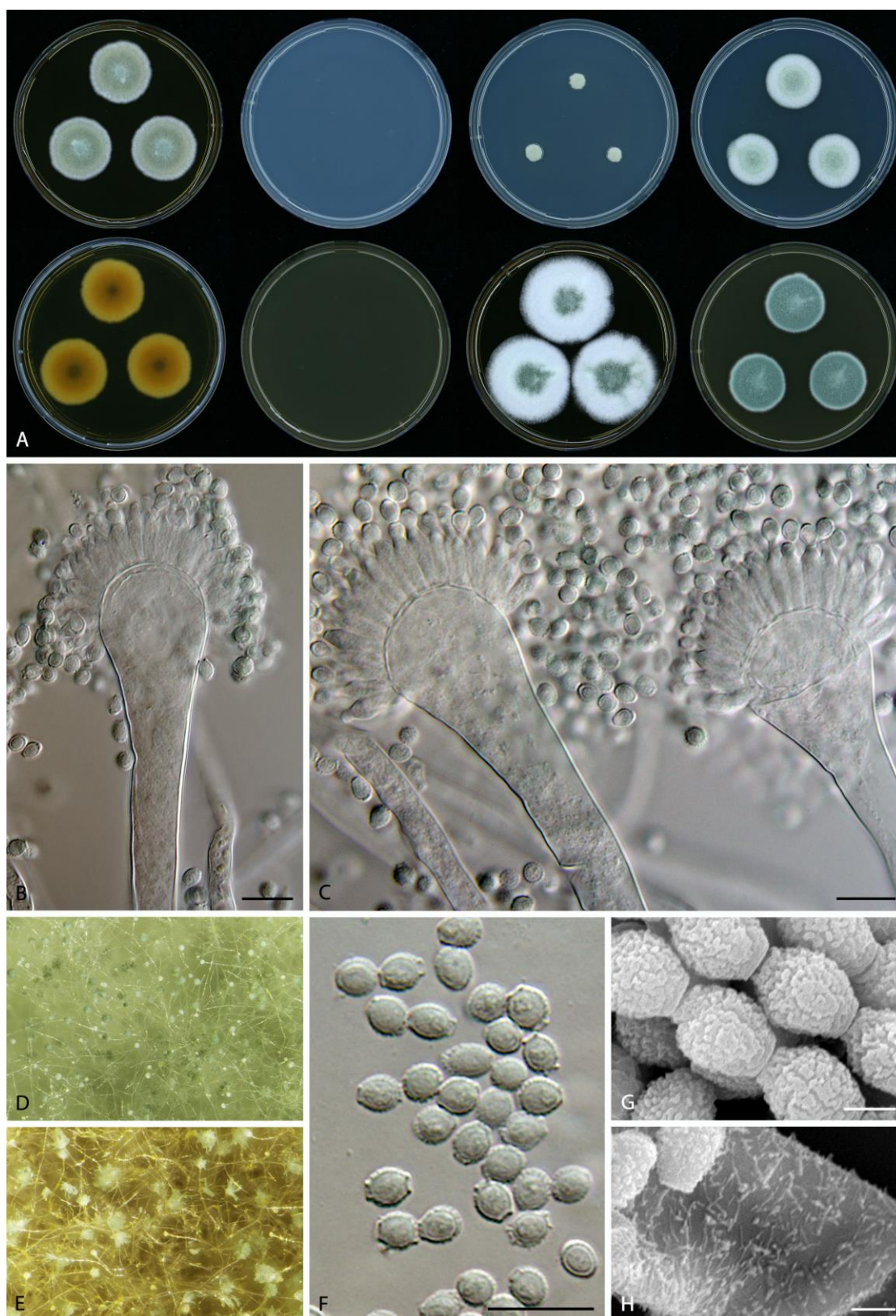
**Obrázek P10.** *Aspergillus penicillioides*. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.





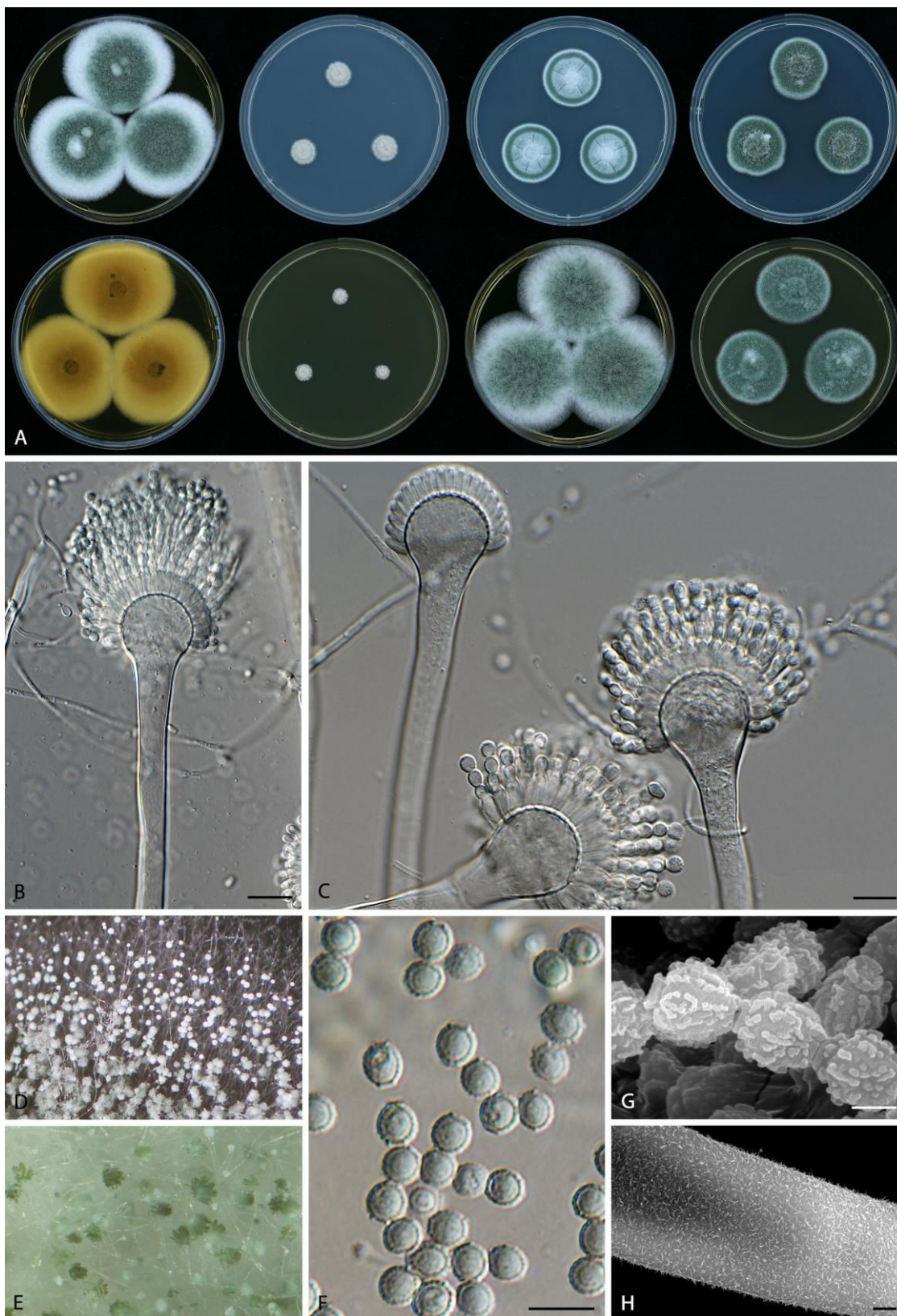
**Obrázek P11.** *Aspergillus penicillioides* „sp. 2“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítko: B, C, F = 10  $\mu\text{m}$ ; G, H = 2  $\mu\text{m}$ .





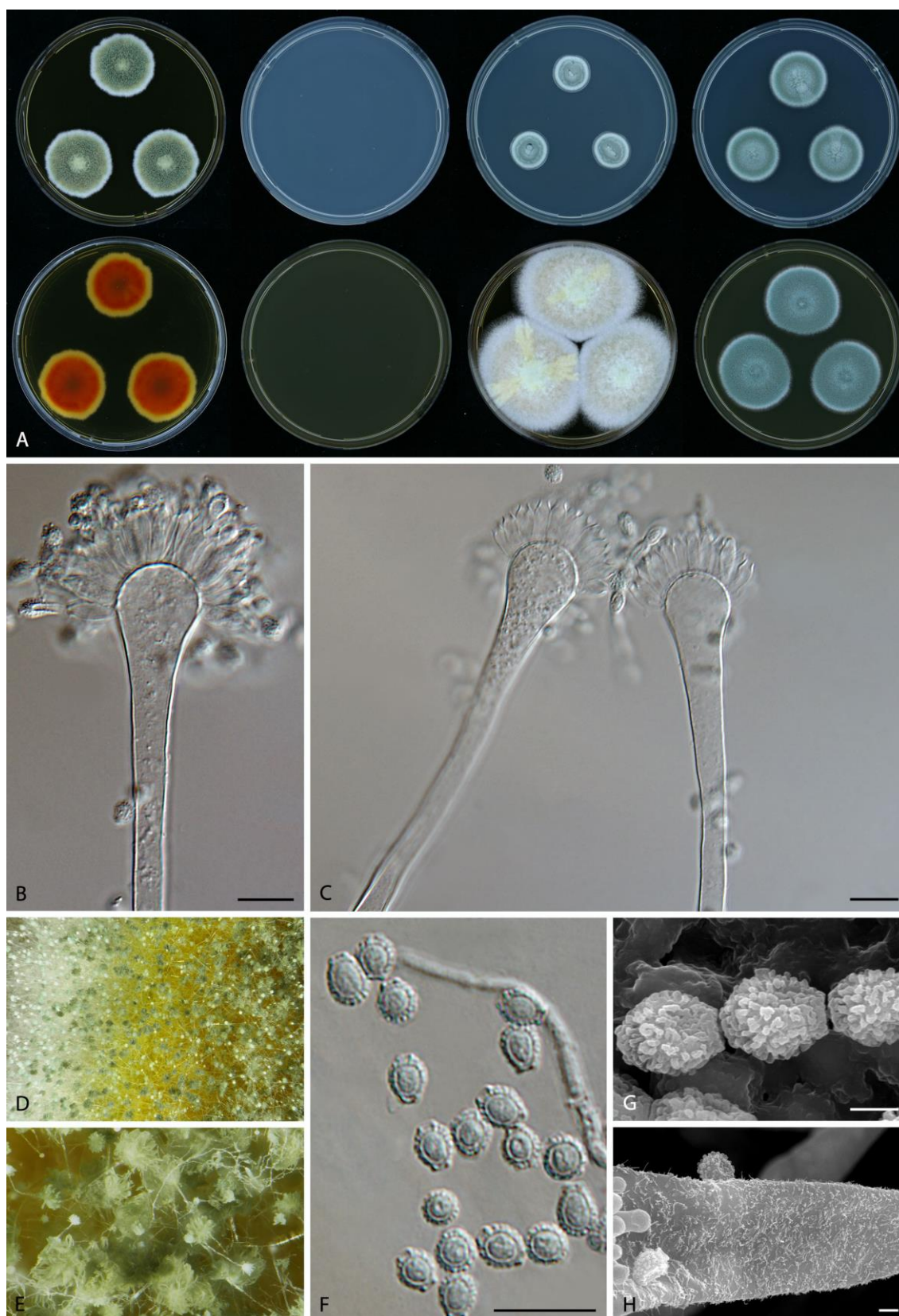
**Obrázek P12.** *Aspergillus penicillioides* „sp. 3“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu\text{m}$ ; G, H = 2  $\mu\text{m}$ .





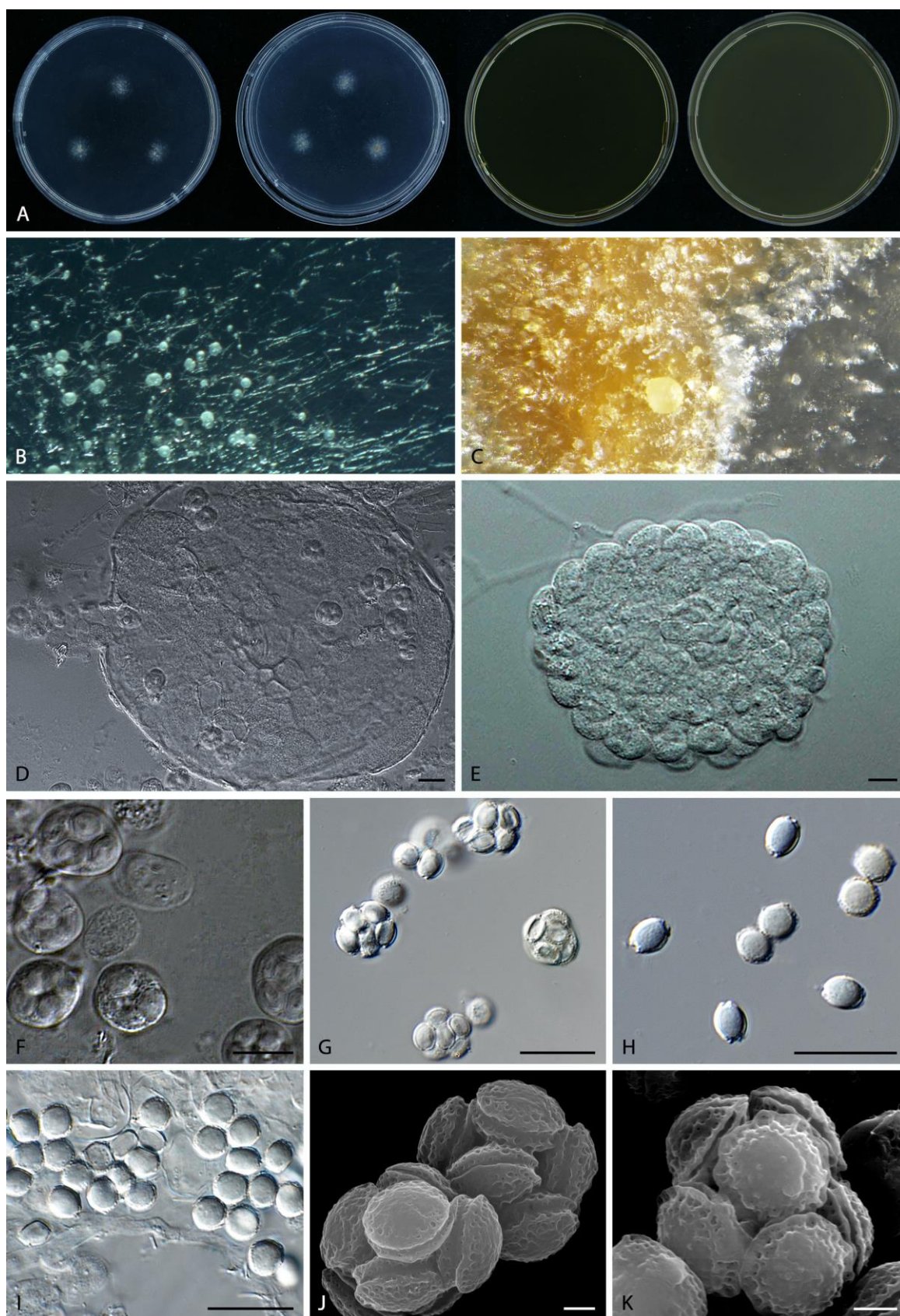
**Obrázek P13.** *Aspergillus penicillioides* „sp. 4“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítka: B, C, F = 10  $\mu\text{m}$ ; G, H = 2  $\mu\text{m}$ .





**Obrázek P14.** *Aspergillus penicillioides* „sp. 5“. A. Fotografie kolonií, horní řada zleva: M40Y, CYA, CY20S, DG18; spodní řada zleva: M40Y (reverz), MEA, M60Y, MEA + 10% NaCl. B. Konidiofor. C. Konidiofory. D, E. Konidiální hlavice. F. Konidie. G. SEM (konidie). H. SEM (stopka konidioforu). Měřítko: B, C, F = 10  $\mu$ m; G, H = 2  $\mu$ m.





**Obrázek P15.** *Aspergillus halophilicus*. A. Fotografie kolonií, zleva: CZ70S, CZ70S (reverz), M40Y, MEA + 10% NaCl. B–E . Kleistotecia. F, G. Vřečka. H, I. Askospory. J, K. SEM (askospory).